

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA PERIN MARTINS

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA HIPERALGESIA E EDEMA INDUZIDOS
PELA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO
ANQUIRINA 1 (TRPA1)

CURITIBA

2012



ANDRESSA PERIN MARTINS

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA HIPERALGESIA E EDEMA INDUZIDOS
PELA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO
ANQUIRINA 1 (TRPA1)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Luana Fischer

CURITIBA, 2012



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



Ata da defesa de dissertação de mestrado de ANDRESSA PERIN MARTINS

Aos vinte e seis dias do mês de julho do ano de dois mil e doze, foi realizada no Anfiteatro 10 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação da mestranda **Andressa Perin Martins**, intitulada “**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA HIPERLAGESIA E EDEMA INDUZIDOS PELA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE POTÊNCIAL TRANSITÓRIO A1 (TRPA1)**”. A abertura teve início às 09h00min pela Presidente da Banca Examinadora e Orientadora da candidata, Professora Doutora Luana Fisher. A Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou a palavra à aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, a Professora Doutora Luana Fisher passou à palavra a primeira examinadora, Professora Doutora Juliana Chichorro do Departamento de Farmacologia da UFPR. Na sequência, passou a palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Aleksander Roberto Zampronio do Departamento de Farmacologia da UFPR. A aluna respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, a Presidente, Professora Doutora Luana Fisher fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela “Aprovada”, habilitando-a ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Luana Fisher, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com os senhores examinadores.

Curitiba, 26 de julho de dois mil e doze.

Professora Doutora Juliana Chichorro.
UFPR- Membro Titular

Professor Doutor Aleksander Roberto Zampronio
UFPR - Membro Titular

Professora Doutora Luana Fisher
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu forças nos momentos mais difíceis desta caminhada e que permitiu, em seu imenso amor que este momento se tornasse realidade.

A minha família, pelos ensinamentos de vida, incentivo, amor, dedicação e força que demonstraram em todas as etapas de minha vida. Tenho certeza de que vocês foram fundamentais para a concretização desse momento, pois ao lado de tudo conquisto em minha vida, estão vocês, a minha base. Mesmo distantes fisicamente vocês estão sempre presentes em mim, pois sou parte de vocês. Obrigada por tudo. Amo vocês!

A minha orientadora, Luana Fischer, por aceitar me orientar e por me iniciar nesta vida científica. Agradeço pelos ensinamentos, confiança e dedicação durante esta trajetória.

Aos meus amigos, colegas e demais pessoas que estiveram ao meu lado nesta trajetória. Obrigada pelos momentos de alegria e por pintarem em tons coloridos os meus dias mais difíceis.

“A medida de amar é amar sem medias,
Velocidade máxima permitida.”

Humberto Gessinger

RESUMO

A recente descoberta de que o receptor de potencial transitório A 1 (TRPA1) é expresso em células não neuronais trouxe novas perspectivas a respeito de sua função na dor e na inflamação. O objetivo deste estudo foi investigar os mecanismos envolvidos na hiperalgesia (determinada pela redução no limiar mecânico nociceptivo) e no edema (determinado pelo aumento da espessura da pata) induzidos pela ativação do TRPA1. A injeção de alilisotiocianato (AITC) (50; 100 ou 300 µg/pata) na pata de ratos induziu hiperalgesia e edema de forma dose e tempo dependente. A hiperalgesia e o edema induzidos pelo AITC foram bloqueados pela coadministração do antagonista seletivo de TRPA1, HC-030031 (600 ou 1200 µg/pata), assim como o tratamento prévio com oligodeoxinucleotídeo (ODN) antisense (4 injeções intratecais diárias de 5 nmol) bloqueou a hiperalgesia e reduziu o edema e a expressão do TRPA1 em neurônios do gânglio da raiz dorsal. Esses resultados demonstram que a hiperalgesia e o edema induzidos pelo AITC dependem da ativação do TRPA1. A coadministração de antagonista de receptores de neurocininas 1 (L-703, 606, 38 µg/pata) ou de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP₈₋₃₇, 5 µg/pata) reduziu significativamente a hiperalgesia e o edema induzidos pelo AITC, indicando o envolvimento de neuropeptídeos. O tratamento prévio com um degranulador de mastócitos (composto 48/80, quatro injeções diárias de 1, 3, 10 e 10 µg/pata) ou a coadministração de antagonista de receptores H1 (pirilamina, 400 µg/pata), 5-HT_{1A} (way 100, 135, 450 µg/pata) ou 5-HT₃ (tropisetron, 450 µg/pata) também reduziu a hiperalgesia e edema induzidos pelo AITC, indicando o envolvimento de mastócitos, histamina e serotonina. O tratamento prévio com um inibidor de selectinas (fucoïdan, 20 mg/kg), a administração de um inibidor de ciclooxygenase (indometacina, 100 µg/pata) ou de antagonistas de receptores adrenérgicos β1 (atenolol, 6 µg/pata) e β2 (ICI 118, 551, 1,5 µg/pata) também reduziu significativamente a hiperalgesia e edema induzidos pelo AITC, indicando que a migração de neutrófilos, a síntese de prostaglandinas e a liberação de noradrenalina contribuem para a hiperalgesia e edema induzidos pela ativação do TRPA1. Juntos, esses dados demonstram que o TRPA1 medeia alguns dos principais eventos inflamatórios, o que sugere que seu papel na dor e inflamação vai além de sua contribuição para a excitabilidade neuronal.

Palavras-chave: TRPA1; sensibilização do nociceptor; hiperalgesia; edema

ABSTRACT

The recent discovery that transient receptor potential ankiryin 1 (TRPA1), is expressed in non neuronal cells has brought new insights into the function of this receptor in inflammatory pain. The objective of this study was to investigate the mechanisms involved in hyperalgesia (determined by the reduction in mechanical nociceptive threshold) and edema (determined by the increase in paw thickness) induced by TRPA1 activation. The injection of AITC (50, 100 or 300 µg/paw) in the rat paw induced hyperalgesia and edema in a dose and time dependent manner. The hyperalgesia and edema induced by AITC were blocked by the co-administration of the selective TRPA1 antagonist, HC-030031 (600 or 1200 µg/paw), while the pretreatment with antisense oligodeoxynucleotide (ODN) (4 daily intrathecal injections of 5 nmol) blocked the hyperalgesia and edema and reduced the expression of TRPA1 in neurons of the dorsal root ganglion. These results demonstrate that the hyperalgesia and edema induced by AITC are dependent on TRPA1 activation. Co-administration of receptors antagonists of neurokinin 1 (L-703,606, 38 µg/paw) or calcitonin gene related peptide (CGRP₈₋₃₇, 5 µg/paw) significantly reduced AITC-induced hyperalgesia edema, indicating the neuropeptides involvement. Pretreatment with a mast cells degranulador (compound 48/80, four daily injections of 1, 3, 10 and 10 µg/paw) or co-administration of antagonist of H1 receptors (pyrilamine, 400 µg/paw), 5-HT_{1A} (way 100, 135, 450 µg/paw) or 5-HT₃ (tropisetron, 450 µg/paw) also reduced AITC-induced hyperalgesia and edema, indicating mast cells, histamine and serotonin involvement. Previous treatment with a selectin inhibitor (fucoidan, 20 mg/kg), the co-administration of a cyclooxygenase inhibitor (indomethacin, 100 µg/paw) or the β₁ (atenolol, 6 µg/paw) and β₂ (ICI 118, 551, 1.5 µg/paw) adrenergic receptor antagonists, also significantly reduced AITC-induced hyperalgesia and edema, indicating that the neutrophils migration, prostaglandin synthesis and release of norepinephrine contributes to the hyperalgesia and edema induced by TRPA1 activation. Together, these results demonstrate that TRPA1 mediates some of the key inflammatory events, suggesting that its role in pain and inflammation goes beyond their contribution to neuronal excitability.

Keywords: TRPA1; nociceptor sensitization, hyperalgesia, edema

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 A e B - Caracterização da hiperalgesia e edema induzido por AITC

Figura 2 A e B – Seletividade do AITC como agonista de TRPA1

Figura 2 C - Análise por Western Blot da expressão de TRPA1 no gânglio da raiz dorsal referente às lombares L4 e 5 de animais tratados com antisense (i.t.) para TRPA1 ou veículo

Figura 3 A B – Neuropeptídeos contribuem para hiperalgesia e edema mediado pelo TRPA1

Figuras 4 A e B – Mastócitos, serotonina e histamina contribuem para a hiperalgesia e edema induzido pela ativação do TRPA1

Figura 4 C- Protocolo de degranulação de mastócitos

Figura 5 A e B - Migração de células inflamatórias contribuem para a hiperalgesia e edema induzido pela ativação do TRPA1

Figura 6 A e B – Prostaglandinas contribuem para a hiperalgesia e edema induzido pela ativação do TRPA1

Figura 7 A e B – Sistema nervoso simpático e norepinefrina contribuem para a hiperalgesia e edema induzido pela ativação do TRPA1

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs Antiinflamatórios não esteroidais

ANOVA Análise de variância

AITC Alil isotiocianato

ATP Adenosina trifosfato

ADP Adenosina difosfato

AMPc Adenosina monofosfato cíclico

BK Bradicinina

CG Carragenina

CFA Composto Adjuvante de Freud

Ca⁺⁺ Íon cálcio

Ct contralateral

COX Enzima Cicloxigenase

CGRP Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CGRP8-37 Antagonista de receptores do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

DAG Diacilglicerol

DMSO Dimetilsulfóxido

g Grama

HC-O30031 1,2,3,6-Tetrahydro-1,3-dimethyl-N-[4-(1-methylethyl)phenyl]-2,6-dioxo-7H-purine-7-acetamide, 2-(1,3-Dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7H-purin-7-yl)-N-(4-isopropylphenyl)acetamide

HNE 4-hydroxy-2-nonenal

H1 receptor de histamin

ICI 118,551 antagonista de receptor β 2 adrenérgico

IP3 Inositol trifosfato

Ipsi ipsilateral

i.t. Intratecal

i.v. intravenoso

IL Interleucina

L-703, 606 antagonista de receptor NK1

NaCl Solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (salina)

ng Nanograma

NGF Fator de crescimento neural

NK1 neurocinina 1

ODN-antisense Antisense para o receptor TRPA1

PGI2 Prostaciclina

PGs Prostaglandina

pKA Proteína quinase A

pKAcs Subunidade catalítica da proteína quinase A

pKC Proteína quinase C

PIP2 Fosfatidil inositol bifosfato

PLA2 Fosfolipase A2

PPARs Receptores ativadores de proliferação do peroxissomo

PLC Fosfolipase C

PPPi Íons intracelulares polifosfatos

ROS Espécies reativas de oxigênio

SP Substância P

SNC Sistema nervoso central

TNF- α Fator de necrose tumoral-alfa

TRP Receptor de potencial transitório

TRPA1 Receptor de potencial transitório anquirina -1

TRPV1 Receptor de potencial transitório vanilóide -1

μ g Microgramas

5-HT serotonina

5-HT1a receptor de serotonina

5-HT3 receptor de serotonina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 RESPOSTA INFLAMATÓRIA	15
2.2 DOR	18
2.3 MECANISMOS NOCICEPTIVOS PERIFÉRICOS.....	19
2.4 CANAIS TRP (RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO)	23
2.5 RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 (TRPA1)	24
3. OBJETIVOS.....	28
4.PAPER	30
INTRODUCTION.....	31
MATERIAL AND METHODS	32
RESULTS.....	36
DISCUSSION.....	53
5 DISCUSSÃO	59
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

A dor é considerada um dos maiores problemas de saúde pública da sociedade atual e embora nosso conhecimento sobre os mecanismos nociceptivos tenha evoluído muito nos últimos anos, os fármacos utilizados para o controle da dor hoje pertencem à mesma classe de fármacos utilizados há décadas. São principalmente anti-inflamatórios não esteroidais e analgésicos opioides, cujo uso clínico é marcado por um alto índice de insucessos e/ou de efeitos colaterais que se intensificam com o uso crônico. A maioria das condições dolorosas é de origem inflamatória periférica e vários estudos experimentais têm sido conduzidos com o objetivo de identificar novos alvos moleculares para o tratamento da dor inflamatória em sua origem, ou seja, na periferia. Nesse contexto, o recentemente descoberto receptor ionotrópico denominado Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 - TRPA1 tem se mostrado um alvo em potencial.

O TRPA1 é um canal de cátions não seletivo pertencente à superfamília de receptores TRP (Receptores de Potencial Transitório) e expresso principalmente em uma subpopulação de neurônios nociceptivos primários que também expressam o TRPV1. A descoberta mais recente de que o TRPA1 é expresso em células não neuronais (DU et al., 2007; STRENG et al., 2008; EARLEY et al., 2009; GRATZKE et al., 2010) trouxe novas perspectivas sobre a função desse receptor na dor inflamatória (ATOYAN et al., 2009; JAIN et al., 2011). O TRPA1 pode ser ativado *diretamente*, por íons cálcio (DOERNER et al., 2007) ou por substâncias eletrofílicas que se ligam covalentemente a resíduos de cisteína do canal (HINMAN et al., 2006; MACPHERSON et al., 2007a). As primeiras substâncias químicas identificadas como capazes de ativá-lo foram os compostos irritantes presentes em extratos de alho, a alicina (MACPHERSON et al., 2005), e de mostarda, o alil isotiocianato (JORDT et al., 2004). Recentemente foi demonstrado que substâncias endógenas também ativam diretamente o TRPA1, é o caso de metabólitos eletrofílicos das prostaglandinas E2 e D2 (CRUZ-ORENGO et al., 2008; TAYLOR-CLARK et al., 2008) e do 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) (MACPHERSON et al., 2007b; TREVISANI et al., 2007), um aldeído endógeno produzido em altas concentrações através da peroxidação dos fosfolípidios de

membrana, em resposta a lesão tecidual e inflamação. *Indiretamente*, o TRPA1 pode ser ativado por mediadores inflamatórios clássicos, através de vias de sinalização iniciadas após a ativação de receptores acoplados a proteína G (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006; WANG et al., 2008). Portanto, em um tecido inflamado, inúmeros mediadores endógenos liberados localmente levam a ativação do TRPA1. Esta promiscuidade conferiu destaque ao TRPA1 como um receptor chave na dor inflamatória (BANDELL et al., 2004; DAI et al., 2007; MACPHERSON et al., 2007a; MCNAMARA et al., 2007; PETRUS et al., 2007; ANDRADE et al., 2008; FISCHER et al., 2008; WANG et al., 2008).

A dor inflamatória se desenvolve em resposta a mediadores liberados no sítio da lesão tecidual, alguns atuam *diretamente* nos nociceptores, enquanto que outros atuam indiretamente, através de células inflamatórias, para estimular a liberação adicional de mediadores inflamatórios. Os mediadores inflamatórios que atuam *diretamente* nos neurônios nociceptivos podem ser divididos naqueles que ativam os nociceptores, levando à geração do potencial de ação e a percepção da dor, e, naqueles que sensibilizam os nociceptores, aumentando a excitabilidade da membrana e diminuindo a intensidade de estímulo necessária para disparar um potencial de ação (BESSON, 1999). Portanto, a sensibilização do nociceptor é caracterizada por um estado de hiperalgesia durante o qual estímulos nocivos são percebidos como mais dolorosos do que o habitual (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; PARADA et al., 2005). Este é um processo comum a todas as condições de dor inflamatória.

Uma vez que o TRPA1 é receptor ionotrópico, sua ativação na membrana dos neurônios nociceptivos leva à geração do potencial de ação e a percepção de dor. Contudo, um crescente conjunto de evidências tem sugerido que o TRPA1 também desempenha um papel importante na sensibilização do nociceptor (OBATA et al., 2005; PETRUS et al., 2007; DA COSTA et al., 2010). Nesse sentido, um estudo recente de nosso grupo demonstrou que a ativação do TRPA1 em neurônios nociceptivos é essencial para a manutenção da hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (DALL'ACQUA et al., 2012). No entanto, todos esses estudos se concentram nos mecanismos de ativação do TRPA1 neuronal e nas consequências diretas dessa ativação na excitabilidade

do nociceptor. Na literatura não há estudos que investiguem uma possível participação do TRPA1 nos mecanismos clássicos da inflamação. Isto é de especial interesse, uma vez que estudos recentes mostram que a ativação do TRPA1 em células não-neuronais induz a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e prostaglandinas E2 ciceptor e na resposta inflamatória. Portanto, considerando que o TRPA1 é um receptor promíscuo que tem sido encontrado em um número crescente de células não neuronais envolvidas na inflamação, é possível que seu papel na dor inflamatória vá além de sua participação direta na excitabilidade neuronal (ATOYAN et al., 2009; JAIN et al., 2011), conhecidos por contribuir na sensibilização do neurônio. O objetivo deste estudo foi caracterizar a magnitude e a duração da hiperalgesia e do edema induzidos pela ativação do TRPA1 e testar a hipótese de que o TRPA1 contribui para a hiperalgesia inflamatória e para formação de edema ao regular múltiplos mecanismos inflamatórios.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Inflamação, em seu sentido mais amplo, é uma resposta do hospedeiro à lesão tecidual. O processo inflamatório foi inicialmente descrito por Cornelius Celsius há mais de 2.000 anos, que instituiu os sinais cardinais (calor, rubor, edema e dor; o quinto sinal cardinal, perda da função, foi descrito posteriormente por Virchow). Para que os sinais cardinais da inflamação tornem-se evidentes, é necessário que ocorra diversos mecanismos hemodinâmicos. Inicialmente, uma rápida vasodilatação aumenta o suprimento sanguíneo local. A permeabilidade vascular aumentada permite que as proteínas imunes solúveis, penetrem no local de lesão, onde possam atacar os agentes invasores. A expressão de moléculas de adesão vascular e de quimiocinas atraem leucócitos, que em seguida, migram para o espaço intersticial, com o objetivo de destruir os agentes patogênicos. Assim, através destes mecanismos há uma rápida ativação e deslocamento de substâncias e células de defesa. Portanto, é importante ressaltar que todas essas etapas que constituem o processo inflamatório (vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e migração celular) são reguladas pela ação de vários mediadores liberados durante uma lesão tecidual (MEDZHITOV, 2008).

O aumento do fluxo sanguíneo é resultado de vasodilatação que normalmente é mediada por agentes inflamatórios, como a histamina, prostaglandinas, óxido nítrico. Esse aumento no fluxo sanguíneo pode explicar os sinais de calor e rubor evidenciados em um processo inflamatório. O extravasamento de plasma rico em proteínas para o espaço extravascular ocorre por uma redução da velocidade do fluxo sanguíneo que é resultado do aumento da permeabilidade vascular e do aumento do fluxo sanguíneo. A redução da pressão osmótica intravascular e aumento da pressão osmótica extravascular decorrente do extravasamento plasmático, somado a pressão hidrostática aumentada devido à vasodilatação, induz a saída e acúmulo de fluido no interstício explicando o desenvolvimento do edema durante a

inflamação aguda. Outro mecanismo envolvido no aumento da permeabilidade vascular inclui a retração das células endoteliais através do envolvimento do citoesqueleto (KUMAR, 2005; LICHTMAN; WILLIAMS, 2006).

Na sequência de eventos de um processo inflamatório, a etapa subsequente é a migração de células inflamatórias para o local da lesão. Os leucócitos são os principais efetores, responsáveis pela fagocitose e eliminação de agentes invasores celulares durante a inflamação. Portanto, a migração de leucócitos do sangue para dentro dos tecidos representa um dos componentes mais importantes da resposta inflamatória, pois possibilita o acesso destas células ao local lesado. Os leucócitos circulantes migram dos vasos para os tecidos tanto em condições normais quanto em circunstâncias patológicas. Na inflamação, à medida que o fluxo sanguíneo se lentifica em decorrência da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular, os leucócitos assumem uma posição mais periférica, processo este chamado de marginação. Posteriormente, os leucócitos aderem temporariamente ao endotélio e iniciam um processo de rolagem até o momento que conseguem atravessar a membrana e passar para o espaço extravascular. A direção da locomoção das células no espaço extravascular é determinada pela fonte de atrativos/quimiotáticos no ambiente local (quimiotaxia) (LANGER; CHAVAKIS, 2009). Após a sua chegada ao local desejado, essas células fagocíticas são responsáveis por conter e destruir microorganismos patogênicos através da fagocitose e liberação de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas presente em seus grânulos. Contudo, essas substâncias podem destruir não somente o agente agressor, mas também os tecidos circundantes promovendo danos teciduais. Durante o processo de migração da corrente sanguínea para o espaço extravascular, os leucócitos podem lesionar a parede dos vasos, correndo o risco de provocar trombose ou edema (YONEKAWA; HARLAN, 2005).

Após iniciado, o processo inflamatório pode se resolver de maneira adequada, neutralizando e eliminando o agente agressor e restaurando o tecido afetado. O processo de resolução envolve a neutralização e eliminação do agente agressor, normalização da permeabilidade vascular e cessação da infiltração leucocitária (WEIGERT et al., 2009). Entretanto, o processo inflamatório pode seguir outro curso que não a resolução e progredir para um

processo inflamatório crônico como resultado da persistência do agente agressor ou falhas nos processos de resolução (KUMAR, 2005)

Dentre os mediadores do processo inflamatório, podemos citar os neuropeptídeos, que compõem o clássico processo de inflamação neurogênica. Esse processo de inflamação neurogênica refere-se a uma série de respostas inflamatórias geradas pela liberação de neuropeptídeos como de substância P (SP) e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), a partir de terminais de neurônios sensoriais primários.

A substância P foi descoberta em 1931 por von Euler e Gaddum. É um neuropeptídeo formado por 11 aminoácidos, encontrada no sistema nervoso central (SNC) e periférico. Altas concentrações de substância P são encontradas na substância negra, no mesencéfalo, na região pré-óptica do hipotálamo, dentre outras. Na periferia, a substância P é encontrada nos aferentes primários (fibras A δ e C) (OTSUKA; YOSHIOKA, 1993). Suas ações são mediadas, principalmente, através de receptores NK1, que são receptores do tipo metabotrópicos, acoplados a proteína G (REGOLI et al., 1994) que podem causar vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular diretamente, ou através da liberação de histamina.

O CGRP é um neuropeptídeo multifuncional cuja sua imunorreatividade é especialmente prevalente no nervo trigêmeo, onde sua expressão é de interesse particular, dado o papel do sistema trigeminovascular na enxaqueca (MESSLINGER, 2009). Nas terminações nervosas periféricas, CGRP é reconhecido como o peptídeo vasodilatador mais potente, e suas respostas são mediadas através de receptores acoplados a proteína G (BRAIN; GRANT, 2004). Além da vasodilatação, a liberação periférica de CGRP, juntamente com a liberação de substância P, podem desencadear degranulação de mastócitos, que contribui para inflamação neurogênica (BRAIN; GRANT, 2004; THEOHARIDES et al., 2005).

Em suma, a estimulação de nervos periféricos induz a liberação antidrômica de neuropeptídeo, cujos principais representantes são substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que, ao ativar seus receptores espalhados em diferentes células, induzem a ativação de múltiplos mecanismos inflamatórios, dentre eles acentuado aumento da permeabilidade

vascular e de extravazamento de plasma, fenômeno que pode explicar o edema causado ao se ativar fibras aferentes primárias.

2.2 DOR

Na presença de estímulos nocivos o organismo aciona respostas protetoras apropriadas, dentre elas a sensação de dor que funciona como um alerta ao dano tecidual (WOOLF; SALTER, 2000; JULIUS; BASBAUM, 2001). Portanto, o adequado funcionamento do sistema sensorial é de fundamental importância para proteger o organismo de danos teciduais. Contudo, quando submetido a condições patológicas e/ou persistentes, esse sistema nociceptivo pode ficar sensibilizado e a dor assume caráter crônico perdendo suas características de alerta e proteção, transformando-se em uma doença (ZEILHOFER, 2005).

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (em inglês, IASP), a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada à lesão tecidual real ou potencial (MERSKEY; BOGDUK, 1994). Já o termo nocicepção está relacionado com o componente sensorial da dor, ou seja, é a consequência do estímulo nocivo sobre o sistema sensorial e nervoso.

A dor também pode ser avaliada em animais, através da observação comportamental de movimentos estereotipados clássicos da espécie que são evidenciados após a estimulação nociceptiva. Assim sendo, modelos animais de dor são, de fato, modelos de nocicepção (TJOLSEN; HOLE, 1997), uma vez que a discriminação do componente emocional da dor é limitada. A importância desses estudos experimentais em animais encontra-se no fato de que eles têm contribuído de forma significativa para o entendimento dos múltiplos mecanismos envolvidos na transmissão e processamento da informação nociceptiva. São estudos essenciais para a possível identificação de novos alvos moleculares e para posterior desenvolvimento de drogas que alcancem um maior índice de sucesso no tratamento e controle da dor aliado a menores efeitos colaterais. O conhecimento sobre os mecanismos nociceptivos atingiu avanços significativos, porém contrasta diretamente com a ausência de

avanços nas estratégias terapêuticas. Sabemos que os fármacos utilizados hoje para o controle da dor são os mesmos há décadas, basicamente opioides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que, embora eficazes em grande parte das condições dolorosas, apresentam efeitos adversos que tornam o tratamento clínico limitado (NEGUS et al., 2006; WOODCOCK et al., 2007). O aparecimento da tolerância analgésica e a possibilidade de desenvolvimento de dependência química são alguns dos efeitos adversos apresentados pelos analgésicos opióides. Entre os AINEs, o problema mais frequente está relacionado às complicações gastrintestinais (HENRY et al., 1996; COLLETT, 1998; MERCADANTE, 1999; WHITTLE, 2003).

2.3 MECANISMOS NOCICEPTIVOS PERIFÉRICOS

As terminações nervosas livres dos neurônios aferentes primários que recebem o estímulo nociceptivo na periferia são denominadas nociceptores. Estes estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras, dentre esses, a pele se destaca por receber uma grande quantidade de estímulos nociceptivos periféricos (JULIUS; BASBAUM, 2001). Estes nociceptores são classificados através de sua localização, velocidade de condução e pelas propriedades que o fazem gerar resposta, podendo eles ser ativados por várias formas de energia, como por exemplo, estímulos mecânicos, elétricos, térmicos e químicos. Uma classe de fibras nociceptivas são as fibras mielinizadas do tipo A δ , de diâmetro médio e condução rápida que respondem a estímulos mecânicos e térmicos. Outra classe engloba fibras do tipo C, não-mielinizadas de pequeno diâmetro e condução lenta, chamadas também de nociceptores polimodais, pois tendem a responder a estímulos térmicos, químicos e mecânicos. Sob condições inflamatórias as fibras polimodais são principalmente estimuladas por uma variedade de substâncias neuroativas como íons potássio, íons hidrogênio, adenosina trifosfato (ATP), bradicinina, dentre outras que são liberadas por células que sofreram lesão (COUTAUX et al., 2005). Há uma sub-população de nociceptores chamada nociceptores silenciosos (*“silent or sleeping” - nociceptors*), que normalmente

não são responsivos a estímulos, a menos que sejam previamente sensibilizados. A lesão tecidual seguida de inflamação (estímulo nocivo químico), mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico) podem induzir a sensibilização desses nociceptores. Uma vez sensibilizados, esses nociceptores podem ser facilmente ativados, podendo inclusive apresentar atividade espontânea (JULIUS; BASBAUM, 2001). Além disso, os nociceptores promovem transdução de sinais, isto é, a conversão de estímulos físicos em correntes despolarizantes que percorrem a membrana da célula. Esse fenômeno ocorre quando um estímulo é capaz de promover correntes de íons não específicos. A abertura de canais de sódio e de cálcio ou o fechamento de canais de potássio, por exemplo, podem levar a despolarização da fibra nociceptiva (UEDA, 1999). Quando a despolarização atinge um determinado limiar os canais de sódio voltagem-dependentes abrem-se deflagrando um potencial de ação. Recentes avanços na biologia molecular têm levado pesquisadores a identificar, clonar e investigar receptores bioquímicos localizados na membrana das fibras aferentes primárias que atuam como estruturas transdutoras de sinal. Dentre esses transdutores, podemos citar os receptores da família TRP, que participam da transdução de estímulos nociceptivos químicos, térmicos e mecânicos (LEVINE; ALESSANDRI-HABER, 2007). A etapa seguinte após a despolarização do nociceptor e a transdução de sinais é a transmissão da informação nociceptiva para níveis centrais. As fibras aferentes primárias projetam o sinal para o corno dorsal da medula espinhal. Alguns neurônios têm origem em múltiplas vias ascendentes, incluindo os tratos espinotalâmicos e espinoreticulotalâmicos, que carregam a informação nociceptiva para o tálamo e para o tronco cerebral, respectivamente. A partir daí a informação chega a estruturas corticais, onde é processada e interpretada (BASBAUM et al., 2009).

Atualmente é bem determinado, que a dor de origem inflamatória é amplamente dependente de mediadores químicos liberados pelos neurônios sensoriais e simpáticos e por células não neuronais (BESSON, 1999). Nosso conhecimento atual sobre dor inflamatória evoluiu muito nas últimas décadas desde que em 1971, John R. Vane, um pesquisador britânico, com a colaboração de um proeminente pesquisador brasileiro, Sérgio H. Ferreira,

descobriram o mecanismo de ação das drogas do tipo da aspirina: a inibição da síntese enzimática de prostaglandinas. Essas substâncias já eram consideradas mediadoras do processo inflamatório. Todavia, as prostaglandinas não induziam dor, o que punha em dúvida a validade do mecanismo de ação proposto. Acidentalmente, observaram que as prostaglandinas produziam hiperalgesia, isto é, sensibilização dos receptores de dor. Hoje é aceito que a dor inflamatória depende de dois mecanismos: um que sensibiliza os nociceptores através de mediadores inflamatórios gerando o processo de hiperalgesia. Este é o resultado da ativação do sistema de sinalização intracelular proteína G/AMPC (monofosfato de adenosina cíclico), que produz aumento dos níveis de cálcio citosólicos, fechamento de canais de potássio e torna funcionais (por fosforilação ou neoformação) alguns canais de sódio da membrana do neurônio. Isso promove uma manutenção no processo de sensibilização da fibra nociceptiva. E outro mecanismo que ativa o nociceptor, gerando processos de nocicepção declarada (LENT, 2001).

Como citado anteriormente as prostaglandinas estão dentre os mais importantes mediadores inflamatórios responsáveis pela sensibilização dos neurônios nociceptivos primários e, conseqüentemente, pela dor inflamatória. Prova irrefutável disso é a eficácia analgésica dos AINES, que ainda são os fármacos mais utilizados para tratamento e controle da maioria das condições dolorosas e cujo principal mecanismo de ação depende da inibição da síntese enzimática de prostaglandinas. Agentes pró-inflamatórios como citocinas, mitógenos e endotoxinas, desencadeiam a síntese de prostaglandinas derivadas do ácido aracdônico pela indução da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), formando um anel pentano e recebendo várias insaturações. As prostaglandinas são divididas de acordo com sua estrutura e função, produzindo efeitos biológicos diferentes. A síntese das PGs inicia-se com a COX catalisando a adição de oxigênio molecular ao ácido araquidônico, formando-se um produto intermediário, o PGG₂. No outro lado da membrana, a COX cumpre sua função como peroxidase, reduzindo a PGG₂ a PGH₂. Estas PGs primárias, por assim dizer, são o substrato para formação das diversas PGs com atividade, como PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} e prostaciclinas (PGI₂) (OKUDA et al., 2002). A sensibilização do nociceptor primário induzida pela PGE₂, por exemplo, é dependente da ativação dos receptores de prostaglandina (EP₁,

EP₂, EP₃ e EP₄), que pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteína G. Desta forma, dependendo de qual receptor EP é ativado, podemos ter diferentes vias de sinalização a partir de diferentes proteínas G (BREYER et al., 2001; NARUMIYA; FITZGERALD, 2001).

Outras substâncias envolvidas na inflamação interagem com as fibras nociceptivas. É o caso da bradicinina, que é produzida quando a calicreína, um polipeptídeo de ação proteolítica, atua sobre globulinas do plasma ou de outros tecidos. O receptor B2 de bradicinina é do tipo metabotrópico e responsável pelos efeitos de curto prazo da bradicinina, já o receptor B1 é induzível e expresso em resposta a agentes pró-inflamatórios, apresentando uma característica de resistência a dessensibilização. Portanto essa característica pode explicar os efeitos de longo prazo da bradicinina no processo inflamatório, dentre eles desenvolvimento de sensibilização da fibra nociceptiva (MARCEAU et al., 1998).

As citocinas são pequenas proteínas liberadas pelos linfócitos, monócitos e macrófagos, que juntamente com a bradicinina tem relação com o dano tecidual e as respostas inflamatórias. Algumas citocinas são pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8), enquanto outras são anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-3) e ainda existem outras com diferentes categorias de efeitos. As citocinas próinflamatórias podem induzir a liberação de prostaglandinas e de aminas simpatomiméticas e possuem grande poder de gerar hiperalgesia, dentre elas, as que possuem maior capacidade de sensibilizar as fibras nociceptivas são a IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-6. Em algumas situações a estimulação do sistema simpático pela IL-8, pode contribuir para a indução da hiperalgesia (COUTAUX et al., 2005). Em relação aos mecanismos moleculares responsáveis por essa sensibilização, tem sido sugerido que as prostaglandinas e as aminas simpatomiméticas, são responsáveis, em última instância, por diminuir o limiar de excitabilidade neuronal, pois ativam receptores metabotrópicos, levando ao aumento de cálcio intracelular, fechamento de canais de potássio e fosforilação de canais de sódio (VERRI et al., 2006). Além disso, os nociceptores possuem receptores para algumas citocinas, como é o caso do TNF- α , que por sua vez pode induzir sensibilização do nociceptor. Este mecanismo pode explicar porque alguns pacientes quando

tratados com antagonistas de $\text{TNF-}\alpha$, muitas vezes, apresentam alívio da dor 24h antes da inflamação local ser controlada (BARRERA et al., 2002).

2.4 CANAIS TRP (RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO)

Muitas moléculas de transdução da informação nociceptiva têm sido identificadas na última década. Dentre elas o maior grupo de detectores de estímulos nocivos é a família de receptores ionotrópicos de potencial transitório (TRPs) (CHEN et al., 2008; PATAPOUTIAN et al., 2009). Esta família de canais de cátions é dividida em sete subfamílias: TRPCs (canônicos), TRPNs (no mechano-potential), TRPMs (melastatínicos), TRPMLs (mucolipínicos), TRPVs (vanilóides), TRPPs (policistínicos), TRPAs (anquirínicos) (NILIUS; VOETS, 2005; MINKE, 2006). Os canais TRPs têm diferentes papéis fisiológicos, que incluem funções como canais operados por cálcio (ex. TRPC3, TRPC7) (RICCIO et al., 2002; KAZNACHEYEVA et al., 2007), transdução de sinais térmicos (ex. A1, M8, V1, V4) (CATERINA et al., 1997; GÜLER et al., 2002; PEIER et al., 2002; STORY et al., 2003), transdução de sinais mecânicos (ex. A1, C1, V1, V4) (LIEDTKE et al., 2003; WALKER et al., 2003; COREY et al., 2004; MAROTO et al., 2005) e transdução de sinais químicos (ex. A1, M8, V1) (PEIER et al., 2002; BANDELL et al., 2004; ANDERSSON et al., 2008). Todos os canais TRPs são tetrâmeros formados por subunidades com seis domínios transmembrana e poros seletivos para cátions que frequentemente apresentam grande permeabilidade para cálcio (LATORRE et al., 2009) e são expressos em células excitáveis e não excitáveis.

O receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) e o receptor de potencial transitório anquirina tipo 1 (TRPA1) são os receptores de maior destaque quando consideramos a capacidade de detectar estímulos térmicos e químicos em virtude de lesão tecidual e/ou inflamação. Ambos apresentam papel integral nos mecanismos de transdução da dor (BEVAN; ANDERSSON, 2009) e na inflamação (GEPPETTI et al., 2008).

Os receptores da família vanilóide (TRPV) são divididos em seis membros - 1 ao 6. No entanto, somente a subfamília TRPV1 é realmente ativada por vanilóides, sendo seu composto ativador a capsaicina, uma substância encontrada em algumas pimentas. A capacidade da capsaicina em ativar nervos sensitivos foi determinada por Jancsó na década de 1960 (JANCSÓ et al., 1967). Porém, somente 15 anos mais tarde a presença de um receptor de capsaicina na membrana plasmática dos nervos sensoriais foi reconhecida por Szolcsányi e Jancsó-Gábor (1975). Em 1997, ocorreu o avanço mais significativo para pesquisa com o TRPV1, quando o receptor TRPV1 do rato foi clonado por Caterina et al. (1997), posteriormente clonado em seres humanos (HAYES et al., 2000). Com este importante avanço na compreensão do receptor veio a confirmação de que o calor $> 43^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH} < 5,9$ também têm a capacidade de ativar o TRPV1 (TOMINAGA et al., 1998). Atualmente, uma grande variedade de ativadores exógenos e endógenos de TRPV1 já foram identificados, como por exemplo, a cânfora (XU et al., 2005) e a anandamida (ZYGMUNT et al., 1999).

2.5 RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 (TRPA1)

O Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 (TRPA1 – do inglês Transient Receptor Potential Ankyrin 1), que foi inicialmente denominado, ANKTM1 (ankyrin-like with transmembrane domains protein), é o único receptor de membrana da subfamília anquirina identificado em mamíferos até agora e é também o mais recente membro da superfamília TRP. Estruturalmente, contém seis domínios transmembrana e quatorze sequências de proteína do tipo anquirina em sua porção N-terminal, que deu origem a sua nomenclatura (STORY et al., 2003).

Quanto a sua localização, o TRPA1, foi inicialmente encontrado em neurônios nociceptivos primários (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006), e estudos de eletro-fisiologia e imunodeteção mostram que o TRPA1 é expresso em uma sub-população de fibras nociceptivas peptidérgicas do tipo C

que expressam o receptor TRPV1 (INOUE; BRYANT, 2005). A ativação dos canais TRPA1, da mesma forma que o TRPV1, é capaz de despolarizar os nociceptores polimodais C e causar a liberação central e periférica de neuropeptídeos (como SP e CGPR), que medeiam a transmissão da informação nociceptiva e a inflamação neurogênica respectivamente (GEPPETTI, 1996; CATERINA et al., 1997). Por muito tempo, acreditou-se que o TRPA1 era expresso exclusivamente em fibras nociceptivas. Contudo, hoje sabe-se que a expressão e a importância funcional desse receptor não é exclusividade de células neuronais. Por exemplo, o TRPA1 pode ser encontrado em células não neuronais, como células epiteliais (DU et al., 2007; EARLEY et al., 2009; GRATZKE et al., 2010), queratinócitos (ATOYAN et al., 2009), fibroblastos (KOCHUKOV et al., 2006), mastócitos (PRASAD et al., 2008), células enterocromafins (NOZAWA et al., 2009) e isso tem trazido novas perspectivas para a função desse receptor na dor inflamatória. Alguns estudos que mostram a expressão do TRPA1 em células não neuronais, como queratinócitos e fibroblastos encontraram que sua ativação pode afetar a expressão de citocinas pro-inflamatórias, dentre elas IL-1a e IL-1b, bem como induzir a síntese de eicosanoides, como PGE2 e LTB4 que são conhecidos por contribuir nos mecanismos inflamatórios, dentre eles na sensibilização de nociceptores periféricos (ATOYAN et al., 2009; JAIN et al., 2011)

Embora o TRPA1 tenha sido identificado um pouco mais tarde do que o TRPV1, a sua descoberta fez um curso semelhante. Os efeitos do clássico agonista TRPA1, óleo de mostarda (componente ativo - alil isotiocianato, AITC), foram identificados muito anteriormente (KOLTZENBURG; MCMAHON, 1986) que o receptor em si. Este composto era largamente utilizado para induzir inflamação neurogênica, de uma maneira semelhante à capsaicina. O TRPA1 foi clonado por Jaquemar et al. (1999), embora a sua expressão em neurônios de mamíferos não tenha sido relatada até 2003, quando Story et al. o identificou como um receptor para temperaturas frias nocivas. No entanto, a associação entre o TRPA1 e o AITC foi confirmada mais tarde em 2005, quando Jordt e colegas, estabeleceram o TRPA1 como o receptor do AITC. Desde então o óleo de mostarda (AITC) vem sendo utilizado em estudos experimentais como agonista de TRPA1, assim como a capsaicina é utilizada para o TRPV1. A lista de substâncias capazes de ativar o TRPA1 não para de

crescer. Dentre elas encontramos várias substâncias como a alicina (MACPHERSON et al., 2005), diversos irritantes naturais, como cinamaldeído, nicotina, mentol, dentre outros (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2005; KARASHIMA et al., 2009), bem como substâncias endógenas, por exemplo, o HNE (MACPHERSON et al., 2007b; TREVISANI et al., 2007), um aldeído endógeno produzido através da peroxidação dos fosfolípidios de membrana em resposta a lesões teciduais. Além disso, as Prostaglandinas das séries A e J, que em virtude de suas características eletrofílicas, podem ativar diretamente o TRPA1. Essas PGs (PGA_2 , PGA_1 e PGJ_2) são metabólitos formados a partir da PGE_2 , PGE_1 e PGD_2 , respectivamente e se conhece muito pouco sobre seu papel nos mecanismos nociceptivos (CRUZ-ORENGO et al., 2008; TAYLOR-CLARK et al., 2008). Outro elemento importante na ativação do TRPA1 é o íon cálcio (JORDT et al., 2004; NAGATA et al., 2005; DOERNER et al., 2007). A remoção do Ca^{++} intra e extracelular reduz drasticamente a potência de ativação do TRPA1 pelo AITC e diminui a atividade cinética do canal (JORDT et al., 2004; ZURBORG et al., 2007). Entretanto, mesmo fracas ativações do canal podem permitir suficiente influxo de Ca^{++} através do TRPA1, aumentando os seus níveis intracelulares a ponto do Ca^{++} transformar-se no principal estímulo de ativação.

Estudos sobre a estrutura funcional do TRPA1 (HINMAN et al., 2006; MACPHERSON et al., 2007a) justificam o porque de tamanha diversidade de agonistas, pois sugerem que o TRPA1 é ativado diretamente através de ligações covalentes entre substâncias eletrofílicas e aminoácidos específicos do canal, como a cisteína. Além da ativação direta por substâncias endógenas e exógenas, o TRPA1 pode ser ativado ou sensibilizado por mediadores inflamatórios (BANDELL et al., 2004; JORDT et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006; DAI et al., 2007; WANG et al., 2008). Por exemplo, estudos utilizando antagonistas seletivos (PETRUS et al., 2007), ou deleção do gene que codifica o receptor TRPA1 (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006; WANG et al., 2008) demonstraram que a hiperalgesia induzida pela administração de bradicinina na pata depende do receptor TRPA1 que é ativado em resposta a ativação da proteína quinase A (pKA) e da via da fosfolipase C (PLC) pelo receptor B_2 de bradicinina. As vias da PLC e da adenilato ciclase/AMPc podem ser consideradas as principais vias de sinalização celular responsáveis pela

sensibilização do nociceptor primário. Portanto, é fácil supor que o receptor TRPA1 tem papel importante nos mecanismos envolvidos na sensibilização inflamatória.

Dessa forma, o TRPA1 é ativado por uma gama de mediadores inflamatórios e substâncias oxidantes e eletrofílicas ao invés de um único agonista. Portanto, é possível que a ativação do TRPA1 medie parte importante dos efeitos atribuídos a alguns desses mediadores, contribuindo para a instalação e manutenção da hiperalgesia e da inflamação. Entender os mecanismos que se seguem à ativação do TRPA1 é de fundamental importância para determinar a função desse receptor na dor inflamatória e para avaliar seu potencial como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para o controle e tratamento da dor inflamatória.

3. OBJETIVOS

A partir das informações observadas na literatura pertinente e dos questionamentos abordados na introdução, o primeiro objetivo deste trabalho foi caracterizar a magnitude e a duração da hiperalgesia e do edema induzidos pela ativação do TRPA1. O segundo objetivo, foi testar a hipótese de que o TRPA1 contribui para a hiperalgesia inflamatória e para a formação do edema ao modular múltiplos mecanismos inflamatórios.

1. Caracterização da hiperalgesia e do edema induzidos pela ativação do TRPA1:

- A hiperalgesia e o edema induzidos pela administração intraplantar de três doses de AITC foram avaliados por trinta horas após sua administração;
- A seletividade do AITC sobre o TRPA1 foi determinada pelo bloqueio farmacológico do TRPA1 ou pelo silenciamento de seu gene em neurônios aferentes primários.

2. Mecanismos envolvidos na hiperalgesia inflamatória e no edema induzidos pela ativação do TRPA1

- O envolvimento de neuropeptídeos foi avaliado pela habilidade de antagonistas de receptores NK1 ou de receptores de CGRP, em reduzir a hiperalgesia e o edema induzidos pelo AITC;
- O envolvimento de mastócitos e de seus principais mediadores inflamatórios, serotonina e histamina foi avaliado pela habilidade do tratamento com um degranulador de mastócitos ou com antagonistas de receptores H_1 , $5-HT_{1a}$ e $5-HT_3$ em reduzir a hiperalgesia e o edema induzidos pelo AITC;
- O envolvimento de células migratórias inflamatórias foi avaliado pela habilidade de um inibidor de selectinas em reduzir a hiperalgesia e o edema induzidos pelo AITC;

- O envolvimento de prostaglandinas foi avaliado pela habilidade de inibidor não seletivo da COX2 em reduzir a hiperalgesia e o edema induzidos pelo AITC;
- O envolvimento de noradrenalina e do sistema nervoso simpático foi avaliado pela habilidade do tratamento com um depletor de norepinefrina dos terminais simpáticos ou de antagonistas de receptores adrenérgicos β_1 e β_2 , em reduzir a hiperalgesia e o edema induzidos pelo AITC.

Mechanisms underlying transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-mediated nociceptor sensitization and edema

Andressa Perin-Martins ^a Claudia H. Tambeli^b, Carlos Amílcar Parada^b,
Luana Fischer ^a

^a Department of Physiology, Division of Biological Sciences, Federal University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil

^b Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas - UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

Corresponding author:

Luana Fischer, Tel.: +55 41 3361-1738.

E-mail address: fischer@ufpr.br (L Fischer).

Original Article

Keywords: TRPA1; nociceptor sensitization, hyperalgesia, edema

INTRODUCTION

The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is the most recently identified member of the TRP superfamily. It is primarily expressed in a subpopulation of peripheral TRPV1-expressing peptidergic nociceptors (STORY et al., 2003), where its activation increases membrane excitability, leading to overt nociception and neurogenic inflammation. However, the more recent discovery that TRPA1 is expressed in non-neuronal cells has brought new insights into the function of this receptor in inflammatory pain (PRASAD et al., 2008; ATOYAN et al., 2009; JAIN et al., 2011; FERNANDES et al., 2012). In an inflamed site, numerous endogenous mediators locally released can activate TRPA1 by one of two different ways. Indirectly, TRPA1 is activated by classical inflammatory mediators, via signaling pathways initiated downstream their G-protein coupled receptors (GPCR) (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006; WANG et al., 2008). Directly, it is activated by intracellular calcium (DOERNER et al., 2007) and by numerous oxidants formed in inflammatory reactions that interact with cysteine residues at the amino terminus of the channel (TREVISANI et al., 2007; GRAEPEL et al., 2011). This gating promiscuity has conferred to TRPA1 prominence as key receptor involved in inflammatory pain (BANDELL et al., 2004; OBATA et al., 2005; BAUTISTA et al., 2006; KATSURA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008; WANG et al., 2008; YANG et al., 2008; DA COSTA et al., 2010; OKUBO et al., 2012).

Local pain and edema are the most prominent characteristics of inflammation and reliable markers of its severity (BOERS et al., 2001). Inflammatory pain is characterized by a hyperalgesic state during which noxious stimuli are perceived as more painful than usual (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; PARADA et al., 2005). Hyperalgesia results from sensitization of nociceptive fibers by inflammatory mediators released at the site of tissue injury. Some of these mediators act directly on nociceptors, whereas others act indirectly, via inflammatory cells, to stimulate the further release of inflammatory agents. Recent evidences suggest that, in addition to its well known contribution to nociceptor activation and neurogenic edema, TRPA1 activation also leads to

a long lasting period of nociceptor sensitization (TREVISANI et al., 2007; DUNHAM et al., 2008; GRAEPEL et al., 2011; ROBERTS et al., 2011; NAKAMURA et al., 2012). However, the underlying mechanisms are presently unknown. In this study we used allyl isothiocyanate (AITC), the pungent compound in mustard oil, considered a prototypical TRPA1 activator, as a pharmacological tool to investigate the mechanisms underlying TRPA1-mediated hyperalgesia and edema. We have first characterized the magnitude and duration of TRPA1-mediated hyperalgesia and edema by evaluating them for thirty hours after administration of different doses of AITC and by testing the ability of HC-030031, a selective TRPA1 antagonist, or of antisense-ODN against TRPA1 to decrease them. Then we tested the hypothesis that TRPA1 contributes to inflammatory sensitization and edema formation not only by directly increasing nociceptor excitability, but also by regulating numerous inflammatory mechanisms that indirectly contribute to them. With this purpose, we tested the ability of different procedures known to block some of the major inflammatory mechanisms to decrease AITC-induced hyperalgesia and edema.

MATERIAL AND METHODS

ANIMALS

This study was carried out in male Wistar rats (150 - 250 g). The animals were housed in groups of six and maintained on a 12-h light/dark cycle with rat chow and water available *ad libitum*. They were maintained in a temperature-controlled room ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) and handled for at least one week prior to the experiments. The experiments were in accordance with IASP guidelines for the study of pain in animals (ZIMMERMANN, 1983). All animal experimental procedures and protocols were approved by the Committee on Animal Research of the Federal University of Parana about protocol number 484.

DRUGS AND DOSES

Allyl isothiocyanate (AITC, TRPA1 agonist, 50; 100; 300 µg/ paw (ANDRADE et al., 2008); HC 030031 (TRPA1 antagonist, 600; 1200 µg/ paw; (BONET et al., 2012; DALL'ACQUA et al., 2012) CGRP8-37, (CGRP receptor antagonist, 6 µg/paw, (MASSAAD et al., 2004); L-703,606 (NK1 receptor antagonist, 76 µg/paw (NAONO-NAKAYAMA et al., 2010); compound 48/80, (mast cell degranulator, four consecutive daily injections of 1, 3, 10, 10 µg/paw, (ANDRADE et al., 2008); pyrilamine (H₁ receptor antagonist, 400 µg/paw, (PARADA et al., 2001); tropisetron (5-HT₃ receptor antagonist, 450 µg/paw (PARADA et al., 2001); WAY 100, 135 (5-HT_{1A} receptor antagonist 450 µg/paw, (PARADA et al., 2001); fucoidan (nonspecific selectin inhibitor, 20 mg/Kg, i.v, (TAMBELI et al., 2006); indomethacin (cyclooxygenase inhibitor, 100 µg/paw, (TAMBELI et al., 2006); guanethidine (depletor of norepinephrine stores in postganglionic sympathetic terminals, 30 mg/kg s.c., 3 days pretreatment, (TAMBELI et al., 2006); atenolol (β₁ receptor antagonist 6 µg/paw (TAMBELI et al., 2006); ICI 118, 551 (β₂ receptor antagonist, 1.5 µg/paw, (TAMBELI et al., 2006). All drugs were dissolved in 0.9% NaCl, except AITC dissolved in propylene glycol and HC 030031, L-703, 606 and Way 100, 135 dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). HC 030031 and WAY 100, 135 were obtained from Tocris Bioscience, Avonmouth, Bristol, UK; L-703,606 was obtained from Enzo Life Sciences AG, Lausen, Switzerland, the other drugs were obtained from Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil.

All drugs or their vehicle were subcutaneously injected into the plantar surface of the rat's hind paw, except fucoidan (i.v.) and guanethidine (s.c.), which were systemically administered. For intraplantar injections, a 30 gauge needle connected to a of polyethylene tube (PE- 50; Intramedic, Clay Adams, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and also to a 50 µl syringe (Hamilton, Reno, NV, USA) was used. Animals were briefly restrained and the total injection volume was 30 µl. Compound 48/80 was used to degranulate local mast cells before experiments. To this end, a daily administration of crescent doses (1, 3, 10, 10 µg/paw) of compound 48/80 was performed for four consecutive days before AITC injection, as described previously (ANDRADE et al., 2008).

The dose of each drug was based on previous literature data. Since these drugs and doses are classically used in studies of inflammatory mechanisms

and pain, no dose response curves were made to minimize the number of animals used in the experiments.

ANTISENSE OLIGODEOXYNUCLEOTIDES (ODNS)

The functional blockade of TRPA1 receptor expression on peripheral sensory neurons was performed by the intrathecal injection of antisense ODN. The following ODN sequences were used: antisense-ODN 5'-TATCGCTCCACATTGCTAC -3' and the mismatch-ODN 5'-ATTCGCCTCACATTGTCAC -3', which corresponded to the antisense sequence except that six bases were changed. A search on the NCBI database to *Rattus norvegicus* identified no other sequences homologous to that used in this experiment. The ODNs were synthesized by Erviegas (São Paulo, SP, Brazil), lyophilized and reconstituted in 0.9% NaCl.

Antisense- or mismatch-ODN was intrathecally injected as previously described (PAPIR-KRICHELI et al., 1987). Briefly, for each injection, rats were anesthetized with 1/3 O₂ to 2/3 N₂O and halothane at 5% to 1.5%. A 26-gauge needle was inserted in the subarachnoid space on the midline between L5 and L6 vertebrae. A dose of 5 nmol of TRPA1 antisense- or mismatch-ODN (BONET et al., 2012; DALL'ACQUA et al., 2012) was intrathecally administered in a volume of 10 µl (at 1 µl/s) once daily for 4 days. The animals regained consciousness approximately 1 min after discontinuing the anesthetic. Experiments were initiated 1 hour after the last injection.

BEHAVIORAL TEST AND EDEMA MEASUREMENT

Testing sessions were carried out during the light phase (between 09:00 AM and 5:00 PM) in a quiet room maintained at 23 °C. Rats did not have access to food or water during the test and each animal was used once.

Mechanical Hyperalgesia Test - The test chamber consists of acrylic cages (12 x 20 x 17 cm high) with a wire grid floor. A tilted mirror below the grid provided a clear view of the animal's hindpaw. Before paw stimulation, the animals were quiet, without exploratory movements and not resting over the paws. The test consisted of evoking a hind paw flexion reflex with a handheld

force transducer (electronic aesthesiometer, IITC Life Science, Woodland Hills, CA) fitted with a 0.5 mm² polypropylene tip. The tip is applied to the central area of the plantar hindpaw with a gradual increase in pressure. After paw withdrawal, the intensity of the pressure was automatically recorded. The test was performed at defined time intervals (showed in figures) after injection and during test intervals animals returned to their home-cages. The baseline paw withdrawal threshold was defined as the mean of three tests performed before intraplantar injection, being 60 g the upper limit pressure. The nociceptive threshold is defined as the mean of three tests performed, at each time interval. Mechanical hyperalgesia was quantified as the change in the mechanical nociceptive threshold, expressed by the delta (Δ) withdrawal threshold (in g) calculated by subtracting the nociceptive threshold, at each indicated times after injection, from the baseline threshold.

Measurement of Paw Thickness - Paw thickness was measured, with a digital micrometer (Great, MT-045B), before and at several time points (showed in figures) post injection. The results are expressed as paw thickness variation (Δ , in millimeters) calculated by subtracting the value obtained at each time point post treatment from that obtained before treatment. Therefore, significant paw thickness variation was used as a indicative of hind paw edema.

WESTERN-BLOT ANALYSIS OF TRPA1 EXPRESSION

The immunoblot study was conducted as previously described (ROMERO-CALVO et al., 2010) to assess the efficacy of antisense-ODN treatment. Previously stored L5-L6 DRG samples were homogenized with an ultrasonic homogenizer (Sonic Corporation, USA), in a buffer containing 1% Triton X-100, 50 mM Phosphate Buffer, pH 7.4, 8M Urea, 2M thiourea, 1mM EDTA, 1% complete protease inhibitor cocktail (Sigma, USA - P8340), at 4°C. After 20 minutes incubation at 4°C, the samples were centrifuged at 12,000g for 15 minutes at 4°C, and the resulting supernatant was transferred to a new tube. Protein concentration was determined by the Bradford method, and 70 μ g of total proteins from each sample were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes according to standard techniques. Membranes were stained with Ponceau S, and digital images were acquired for the control

of protein loading by densitometric analysis (ROMERO-CALVO et al., 2010). Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk solution in PBS containing 0.1% tween-20, and incubated overnight with anti-TRPA1 (1:1000), followed by HRP conjugated secondary antibody (Zymed, 1:10000). Reactive bands were detected with the Super Signal West Pico chemiluminescent kit. Results are expressed as the ratio between TRPA1 and the corresponding Ponceau S optical densities.

STATISTICAL ANALYSIS

Data are expressed in figures as variation of mechanical hyperalgesia or as increase in paw thickness and are presented as means \pm S.E.M. A two-way repeated measures ANOVA with one between-subjects factor (i.e., treatment) and one within-subjects factor (i.e., time) was used to determine whether there were significant differences among the groups in Figures 1 and 2. To determine if there were significant differences between treatment groups in Figures 3 to 7 one-way ANOVA was performed. Post hoc contrasts using the Tukey test were performed to determine the basis of the significant difference. To determine if there were significant differences between treatment groups in Figures 2 C a t-test was performed. The level of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

1. AITC-INDUCED HYPERALGESIA AND EDEMA

To characterize AITC-induced hyperalgesia and edema we injected different doses of AITC (50, 100 and 300 μ g) into the rat's hind paw and measured mechanical paw withdrawal threshold (the change before-after injection was used as a measure of hyperalgesia) and paw thickness (the change after-before injection was used as used as a measure of edema) for thirty hours thereafter. The subcutaneous injection of AITC into the rat's hind paw induced hyperalgesia (Figure 1 A) and edema (Figure 1 B) in a dose- and time-dependent manner.

As shown in Figure 1 A, AITC-induced hyperalgesia was maximal 3 hours and was still present 30 hours after injection. The hyperalgesia induced by 100 μ g of AITC was higher than that induced by 50 μ g and was similar to that induced by 300 μ g. Two-way repeated-measures ANOVA showed a significant main effect of treatment ($f = 57.65$; $p < 0.001$) and a significant treatment x time interaction ($f = 17.96$; $p < 0.001$).

As shown in Figure 1 B, AITC-induced edema decreased gradually up to 30 hours after injection. The edema induced by 100 μ g of AITC was similar to that induced by 50 μ g and was lower than that induced by 300 μ g. Two-way repeated-measures ANOVA showed a significant main effect of treatment ($f = 18.59$; $p < 0.001$) and a significant treatment x time interaction ($f = 22.51$; $p < 0.001$).

Based on these results the dose of 100 μ g of AITC was used in further experiments.

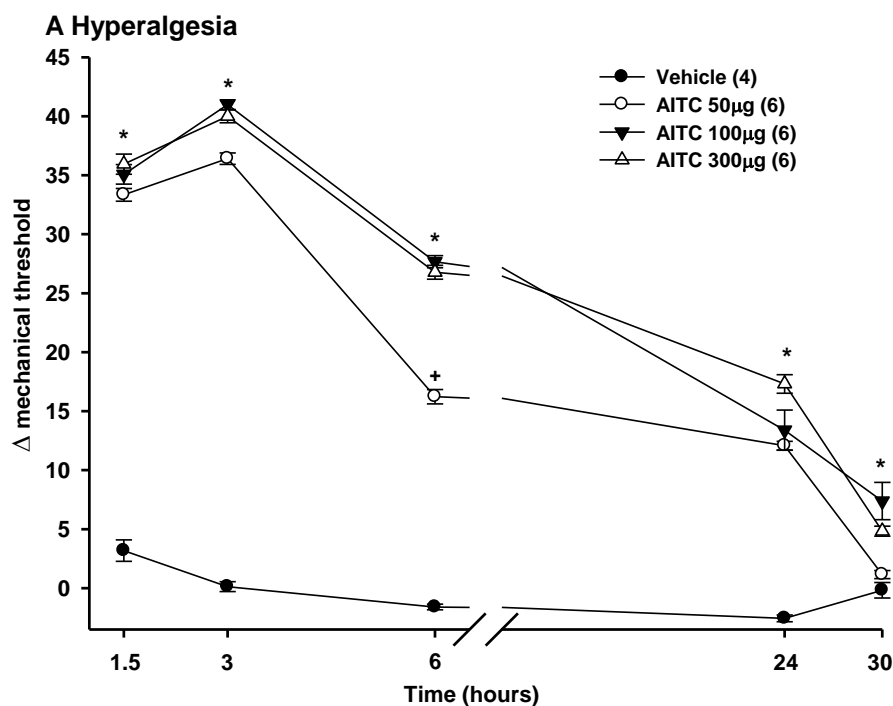
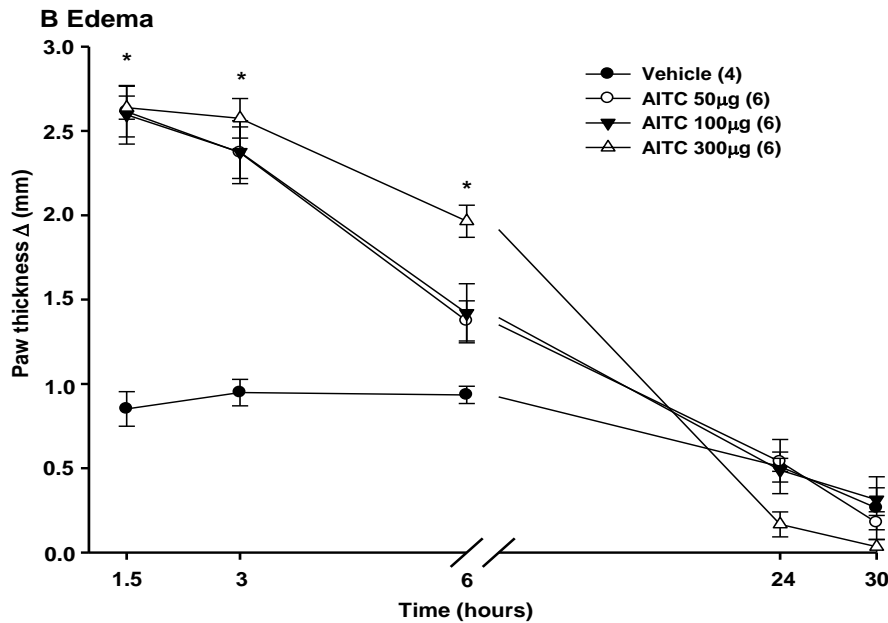


Figure 1: AITC-induced hyperalgesia and edema. A. Hyperalgesia. AITC induced a dose-dependent hyperalgesic response that was maintained up to the 30th hour after its injection. There is a statistically significant interaction between treatment and time ($f = 17.96$ $p < 0.001$, Two Way Repeated Measure ANOVA and Tukey test). The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups. The symbols “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. In this and in subsequent figures data are presented as mean \pm EPM. Numbers in parentheses indicate the number of animals in each group. AITC = allyl isothiocyanate.



B. Edema. AITC induced a significant increase in paw thickness (used as a measure of edema) in the first six hours after its injection. There is a statistically significant interaction between treatment and time ($p < 0.001$, $f = 22.51$. Two Way Repeated Measure ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$). The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups. The symbols “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. AITC = allyl isothiocyanate.

2. SELECTIVITY OF AITC AS A TRPA1 AGONIST

To determine whether AITC induced-hyperalgesia and edema were dependent on TRPA1 activation, we used two different strategies to block TRPA1 function: (a) pharmacological blockade by its selective antagonist HC 030031 (600 and 1200 $\mu\text{g/paw}$) or (b) neuronal gene silencing by antisense-ODN against TRPA1 (intrathecal injection, between L5 and 6, of 5nmol per day, during four days).

As shown in Figure 2 A, AITC-induced hyperalgesia was blocked by the co-administration of HC 030031 at 1200 μg (but not at 600 μg , data not shown) into the ipsilateral but not into the contralateral hind paw. This finding demonstrated that AITC-induced hyperalgesia depends on local activation of TRPA1. AITC-induced hyperalgesia was also blocked by pretreatment with antisense- but not with mismatch-ODN. This finding demonstrated that AITC-induced hyperalgesia depends on activation of neuronal TRPA1. Two-way repeated-measures ANOVA showed a significant main effect of treatment (f

=130.76; $p < 0.001$) and a significant treatment x time interaction ($f = 36.52$; $p < 0.001$).

As shown in Figure 2 B, AITC-induced edema was blocked by the co-administration of HC 030031 into the ipsilateral hind paw, showing that AITC-induced edema depends on TRPA1 activation. The administration of HC 030031 into the contralateral paw decreased AITC-induced edema 90 minutes after administration, suggesting a weak systemic effect. AITC-induced edema was significantly decreased by pretreatment with antisense- but not with mismatch-ODN. This finding demonstrated that AITC-induced edema depends partially on activation of neuronal TRPA1. Two-way repeated-measures ANOVA showed a significant main effect of treatment ($f = 15.13$; $p < 0.001$) and a significant treatment x time interaction ($f = 10.02$; $p < 0.001$).

As shown in Figure 2 C, treatment with antisense-ODN strongly decreased TRPA1 expression in DRG of L5 and L6 (t test $p = < 0.001$), which innervate the plantar surface of the hind paw.

Taken together the results of Figures 1 and 2 indicate that AITC induces long-lasting hyperalgesia and edema through TRPA1 activation. AITC-induced hyperalgesia and edema are around their maximal three hours after injection and the effect of the antagonist or of the antisense-ODN was similar at any time point analyzed. Therefore, the ability of further treatments to decrease hyperalgesia and edema induced by AITC was evaluated three hours after its administration.

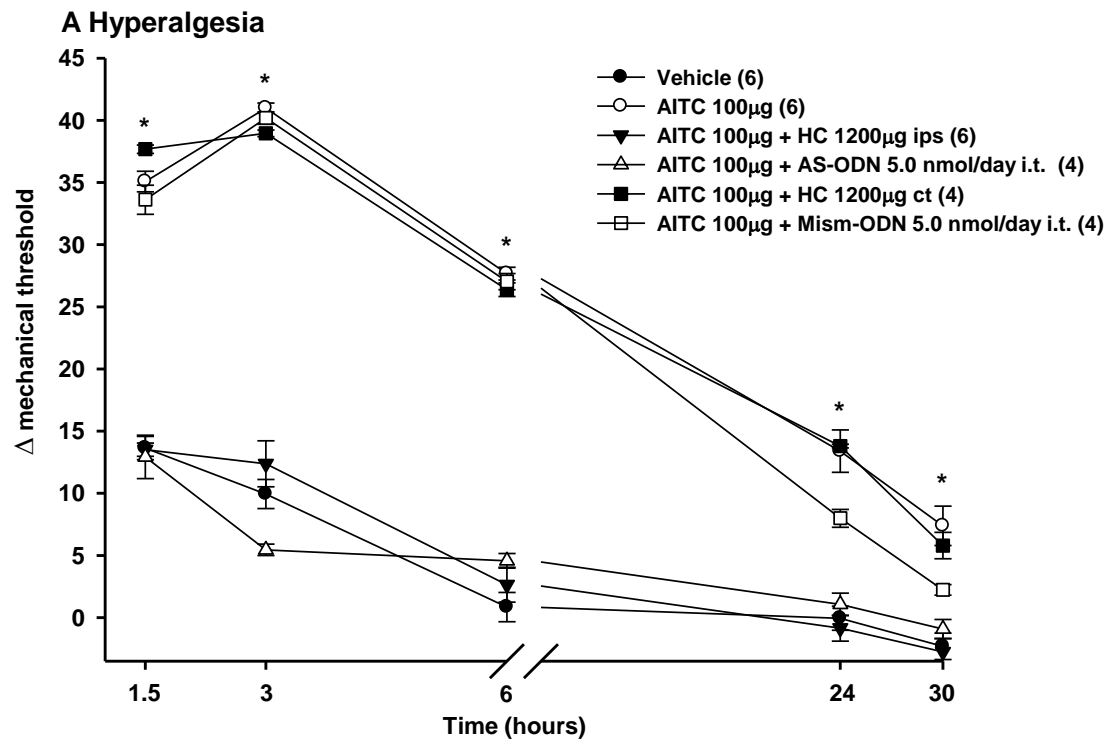
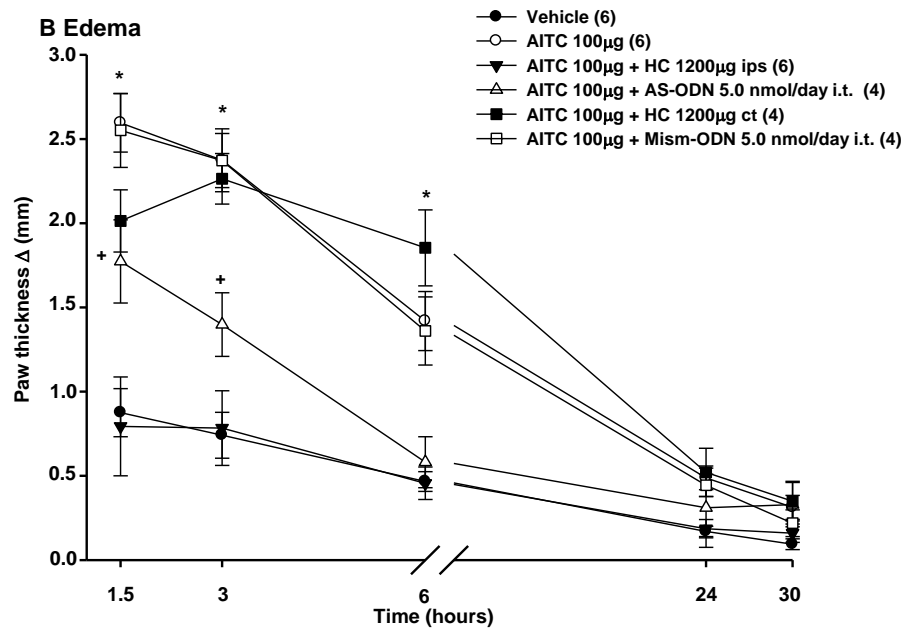
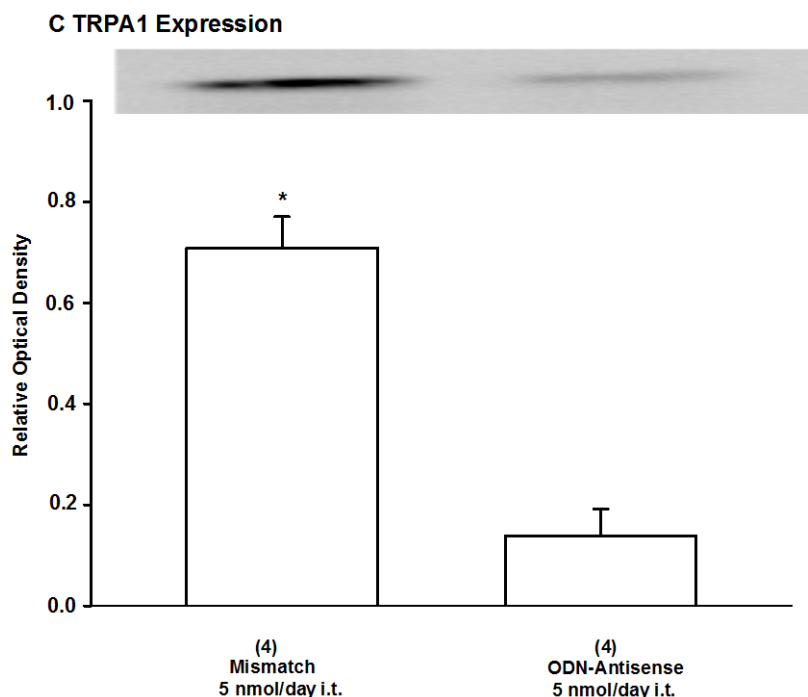


Figure 2: AITC-induced responses are blocked by pharmacological blockade of TRPA1 or by its neuronal gene silencing. A. Hyperalgesia. Ips-, but not contralateral administration of HC or previous treatment with antisense-, but not with mismatch- ODN blocked AITC-induced hyperalgesia at any of the time points analyzed. There is a statistically significant interaction between treatment and time ($p < 0.001$, $f = 36.52$. Two Way Repeated Measure ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$). The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups, “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. HC= HC030031, TRPA1 antagonist; AS-ODN = Antisense-ODN against TRPA1; Mism-ODN = mismatch-ODN; Ips= ipsilateral paw, Ct= contralateral paw.



B. Edema. Ipsi-, but not contralateral administration of HC blocked and previous treatment with antisense-, but not with mismatch- ODN significantly decreased AITC-induced edema. There is a statistically significant interaction between treatment and time ($p < 0.001$, $f = 10.02$. Two Way Repeated Measure ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$). The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups, “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. HC= HC030031, TRPA1 antagonist; AS-ODN = Antisense-ODN against TRPA1; Mism-ODN = mismatch-ODN; Ips= ipsilateral paw, Ct= contralateral paw.



C. TRPA1 expression. Treatment with Antisense-ODN (5nmol per day, intrathecal, during four days) significantly decreased TRPA1 expression in dorsal root ganglia (L5 and L6) cells, as indicated by the symbol “*”, t test, $p = < 0.001$. The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups, “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. HC= HC030031, TRPA1 antagonist; AS-ODN = Antisense-ODN against TRPA1; Mism-ODN = mismatch-ODN; Ips= ipsilateral paw, Ct= contralateral paw.

3. NEUROPEPTIDES CONTRIBUTE TO HYPERALGESIA AND EDEMA INDUCED BY TRPA1 ACTIVATION

The involvement of neuropeptides in AITC-induced hyperalgesia and edema was assessed by evaluating the effect of the co-treatment with L-703,606 (38µg/paw), a NK1 receptor antagonist or with CGRP8-37 (5µg/paw), a CGRP receptor antagonist.

As shown in Figure 3 A, AITC-induced hyperalgesia (One-Way ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$) was significantly decreased by ipsi- but not by contralateral administration of either L-703, 606 or CGRP8-37.

As shown in Figure 3 B, AITC-induced edema was significantly decreased by ipsi- but not by contralateral administration of L-703, 606, while both ipsi- and contralateral administration of CGRP8-37 decreased AITC-induced edema, suggesting a low systemic absorption (One-Way ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$).

These findings suggest that local activation of NK1 and of CGRP receptors contribute to TRPA1-mediated hyperalgesia and edema.

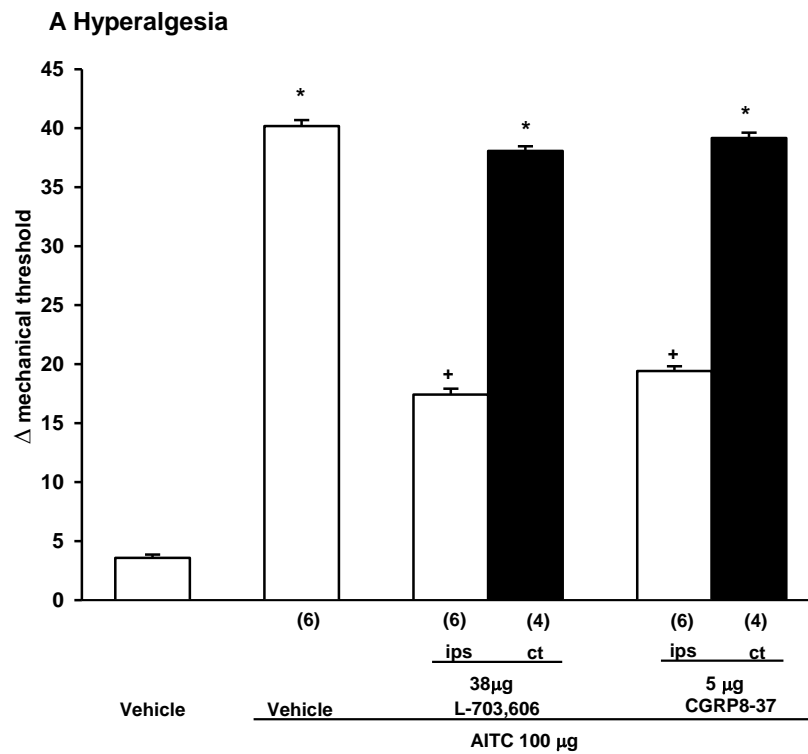
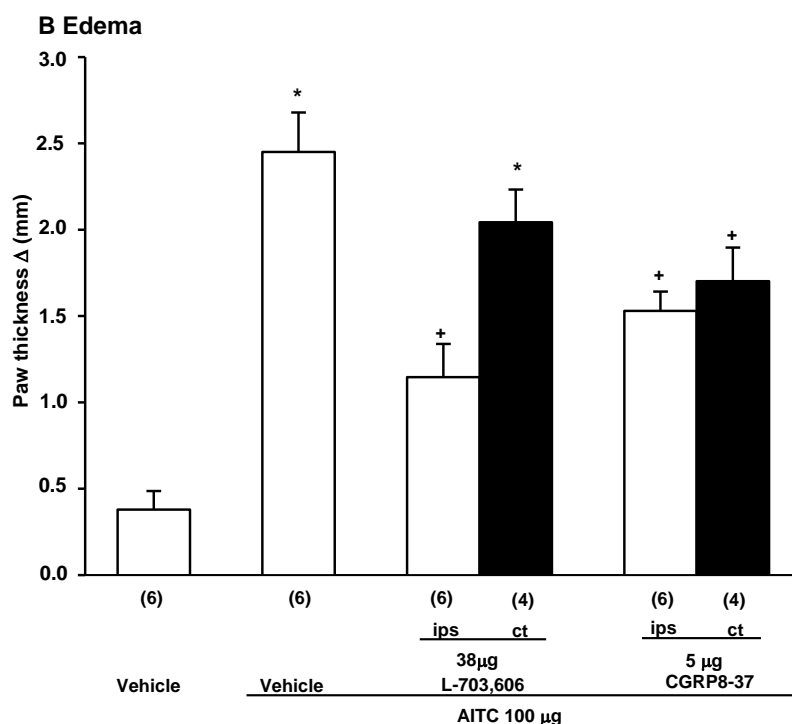


Figure 3: AITC-induced responses are significantly decreased by pharmacological blockade of NK1 or of CGRP receptors. A. Hyperalgesia. Ipsi-, but not contralateral administration of the NK1 receptor antagonist, L-703, 606, or of the CGRP receptor antagonist CGRP8-37 significantly decreased AITC-induced hyperalgesia (One way Anova, and Tukey test, $P > 0.05$). The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups. The symbols “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. Ips = ipsilateral paw; Ct = contralateral paw; L-703,606 = NK1 receptor antagonist; CGRP8-37 = CGRP receptors antagonist.



B. Edema. Ipsilateral administration of L-703, 606 significantly decreased AITC-induced edema. Ipsi- and contralateral administration of CGRP8-37 significantly decreased AITC-induced edema (One way Anova, and Tukey test, $P > 0.05$). The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups. The symbols “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. Ips = ipsilateral paw; Ct = contralateral paw; L-703,606 = NK1 receptor antagonist; CGRP8-37 = CGRP receptors antagonist.

4. MAST CELLS AND THEIR MAJOR MEDIATORS, 5-HT AND HISTAMINE, CONTRIBUTE TO HYPERALGESIA AND EDEMA INDUCED BY TRPA1 ACTIVATION.

The involvement of mast cells, 5-HT (serotonin) and histamine in AITC-induced hyperalgesia and edema was assessed by evaluating the effect of the pretreatment with the mast cell degranulator, compound 48/80 (daily intraplantar injections of increasing doses 1, 3, 10 or 10 μg), or of the co-treatment with Way 100, 135 (450 μg/paw) a 5-HT_{1A} receptor antagonist with tropisetron (450 μg/paw), a 5-HT₃ receptor antagonist or with pyrilamine (400 μg/paw), a H₁ receptor antagonist.

As shown in Figure 4 A, AITC-induced hyperalgesia was significantly decreased either by pretreatment with compound 48/80 or by co-treatment with

Way 100, 135, tropisetron or pyrilamine into the ipsi but not contralateral hind paw (One-Way ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$).

As shown in Figure 4 B, AITC-induced edema was significantly decreased either by pretreatment with compound 48/80 or by co-treatment with Way 100, 135, tropisetron or pyrilamine. While the administration of Way 100, 135 or of pyrilamine into the contralateral hind paw had no effect, that of tropisetron decreased AITC-induced edema, suggesting a low systemic absorption (One-Way ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$).

These findings suggest that mast cell degranulation and the local release of 5-HT and histamine contribute to TRPA1-mediated hyperalgesia and edema.

To ensure that compound 48/80 effectively induced local mast cells degranulation, we compare the nociceptive response induced by a single injection of 10 μg of compound 48/80, with that induced by the same treatment in a group of animals submitted to the protocol of mast cell degranulation (daily intraplantar injections of increasing doses, 1, 3, 10 or 10 μg , of compound 48/80). The absence of nociceptive response in the latter group indicates that local mast cells were completely degranulated at the time of experiment (Figure 4C One way Anova, and Tukey test, $P > 0.05$).

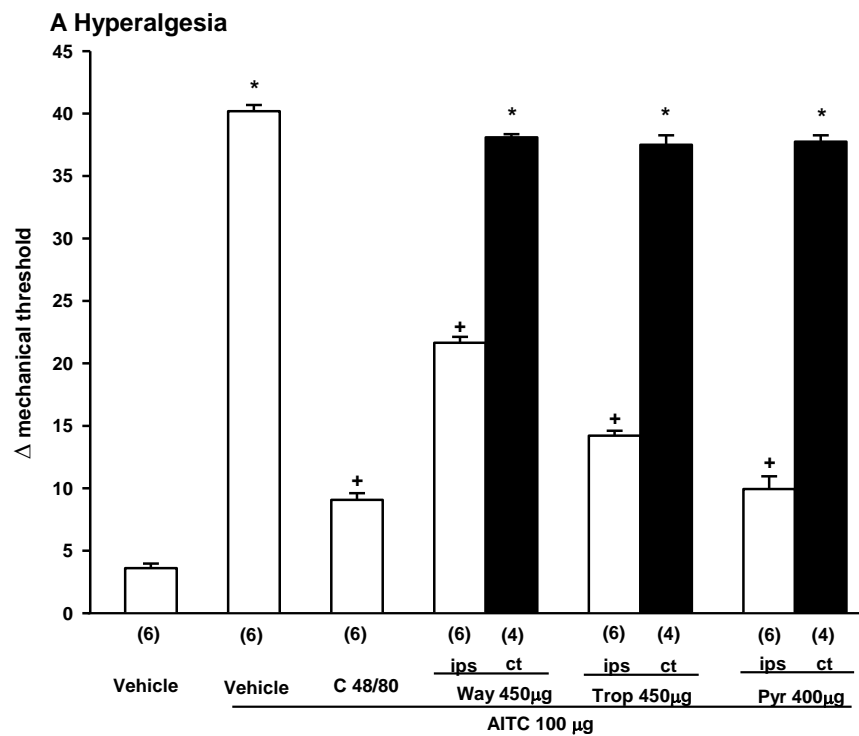
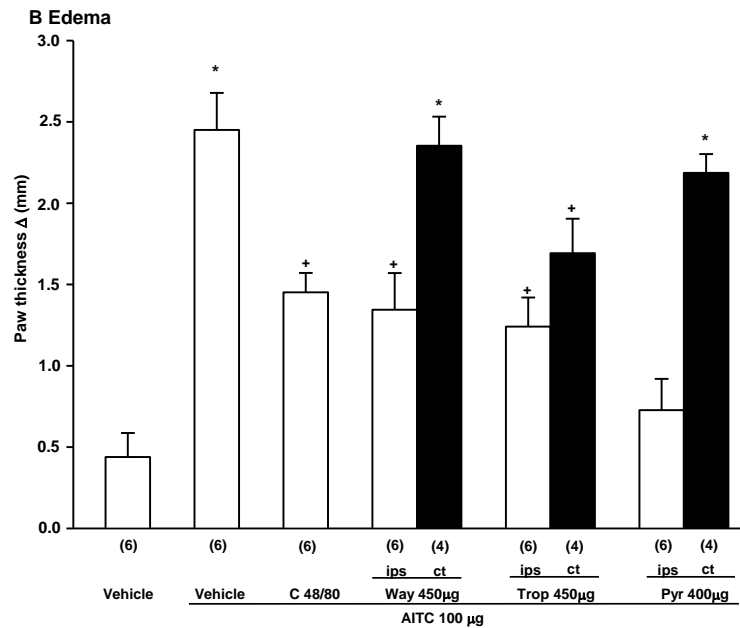
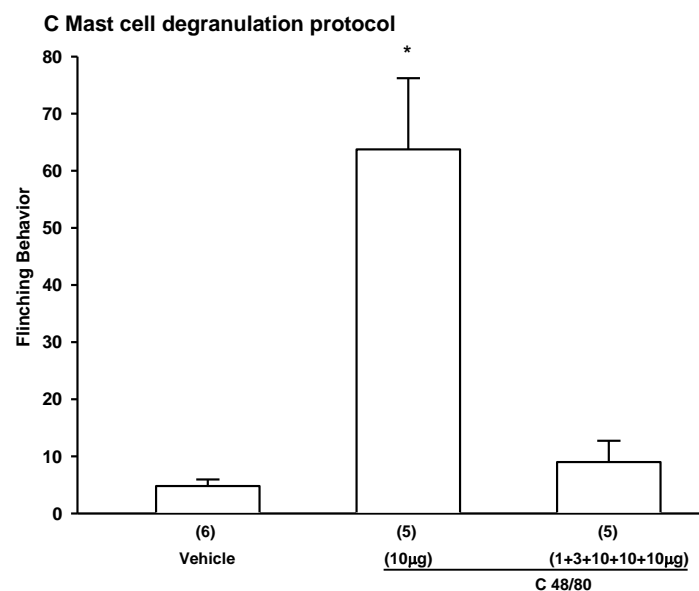


Figure 4: AITC-induced responses are significantly decreased by previous mast cell degranulation or by pharmacological blockade of 5-HT_{1A} and ₃ or H₁ receptors. A. Hyperalgesia. Pre-treatment with compound 48/80, or ipisi- but not contralateral administration of way 100,135, tropisetron or pyrilamine significantly decreased AITC-induced hyperalgesia (One way Anova, and Tukey test, $P > 0.05$). The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups. The symbol “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. C 48/80 = Compound 48/80, mast cell degranulator; Way = Way 100,135; 5-HT_{1A} receptor antagonist; Trop = Tropisetron; 5-HT₃ receptor antagonist; Pyr = Pyrilamine; H₁ receptor antagonist.



B. Edema. Pre-treatment with compound 48/80, or ipsilateral administration of way 100,135, or pyrilamine significantly decreased AITC-induced edema. Ipsi- and contralateral administration of tropisetron significantly decreased AITC-induced edema (One way Anova, and Tukey test, $P > 0.05$). The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups. The symbol “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. C 48/80 = Compound 48/80, mast cell degranulator; Way = Way 100,135; 5-HT_{1A} receptor antagonist; Trop = Tropisetron; 5-HT₃ receptor antagonist; Pyr = Pyrilamine; H₁ receptor antagonist.



C. Mast cell degranulation protocol. A single injection of compound 48/80 induced a significant nociceptive behavior. This same procedure in animals that received four daily intraplantar injections of increasing doses (1, 3, 10 or 10 μg) of compound 48/80 did not (One way Anova, and Tukey test, $P > 0.05$). The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups. The symbol “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. C 48/80 = Compound 48/80, mast cell degranulator; Way = Way 100,135; 5-HT_{1A} receptor antagonist; Trop = Tropisetron; 5-HT₃ receptor antagonist; Pyr = Pyrilamine; H₁ receptor antagonist.

5. INFLAMMATORY CELL MIGRATION CONTRIBUTES TO HYPERALGESIA AND EDEMA INDUCED BY TRPA1 ACTIVATION.

The involvement of migratory cells in AITC-induced hyperalgesia and edema was assessed by evaluating the effect of pre-treatment with the selectin inhibitor fucoidan (20mg/kg, i.v.)

AITC-induced hyperalgesia (Figure 5A, One-Way ANOVA and Tukey test, $p < 0,05$) and edema (Figure 5B, One-Way ANOVA and Tukey test, $p < 0,05$) were significantly decreased by pretreatment with fucoidan. These findings indicate that migratory cells contribute to TRPA1-mediated hyperalgesia and edema.

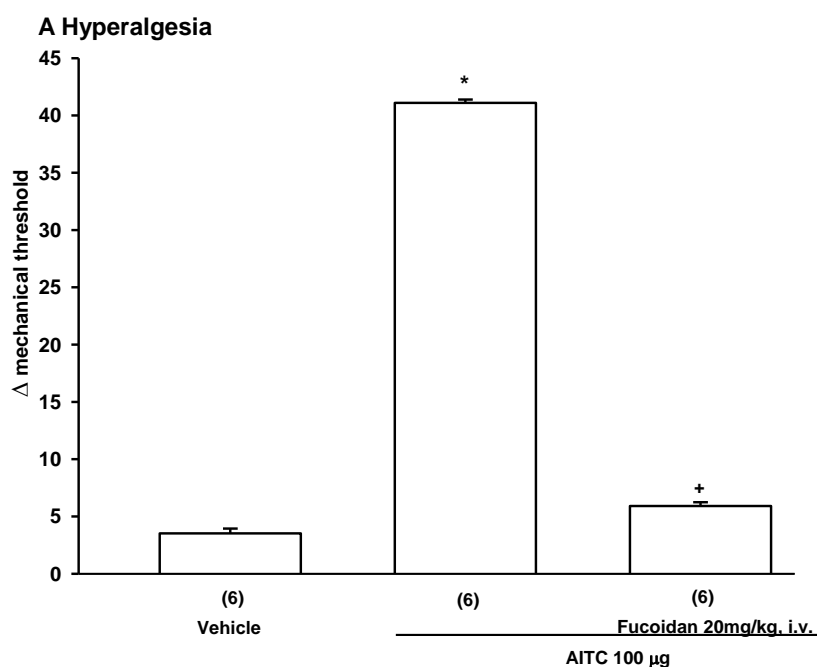
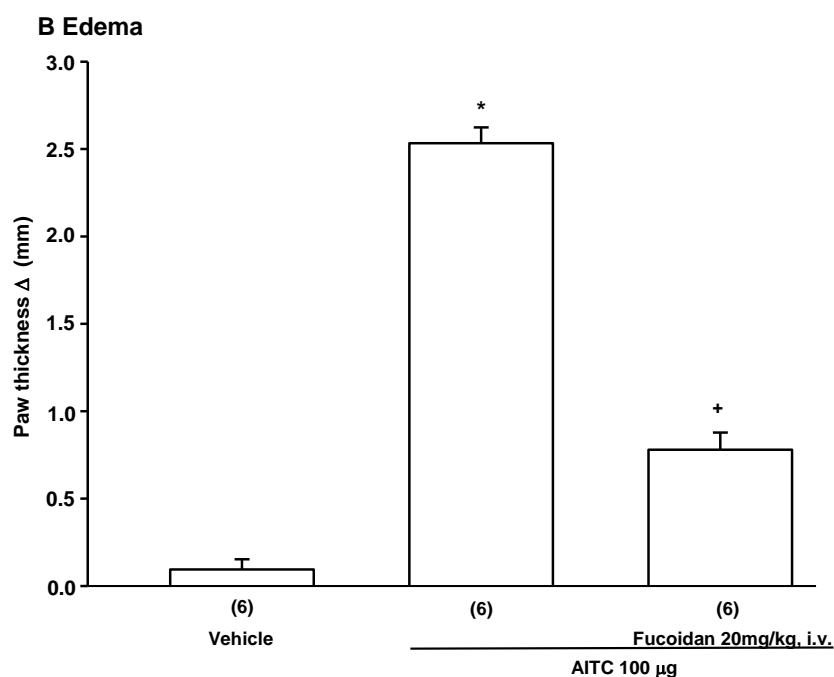


Figure 5: AITC-induced responses are significantly decreased by selectin inhibition. A. Hyperalgesia. Pre-treatment with fucoidan significantly decreased AITC-induced hyperalgesia (One way Anova, and Tukey test, $P > 0.05$). The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups, “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. Fucoidan = migratory cells inhibitor.



B. Edema: Pre-treatment with fucoidan significantly decreased AITC-induced edema (One way Anova, and Tukey test, $P > 0.05$). The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups, “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. Fucoidan = migratory cells inhibitor.

6. PROSTAGLANDINS CONTRIBUTE TO HYPERALGESIA AND EDEMA INDUCED BY TRPA1 ACTIVATION.

The involvement of prostaglandins in AITC-induced hyperalgesia and edema was assessed by evaluating the effect of the co-treatment with indomethacin (100μg/paw), a cyclooxygenase inhibitor.

As shown in Figure 6 A, AITC-induced hyperalgesia (One-Way ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$) was significantly decreased by ipsi- but not by contralateral administration of indomethacin.

As shown in Figure 6 B, AITC-induced edema was significantly decreased by ipsi- and contralateral administration of indomethacin, suggesting a low systemic absorption.

These findings indicate that prostaglandins contribute to TRPA1-mediated hyperalgesia and edema.

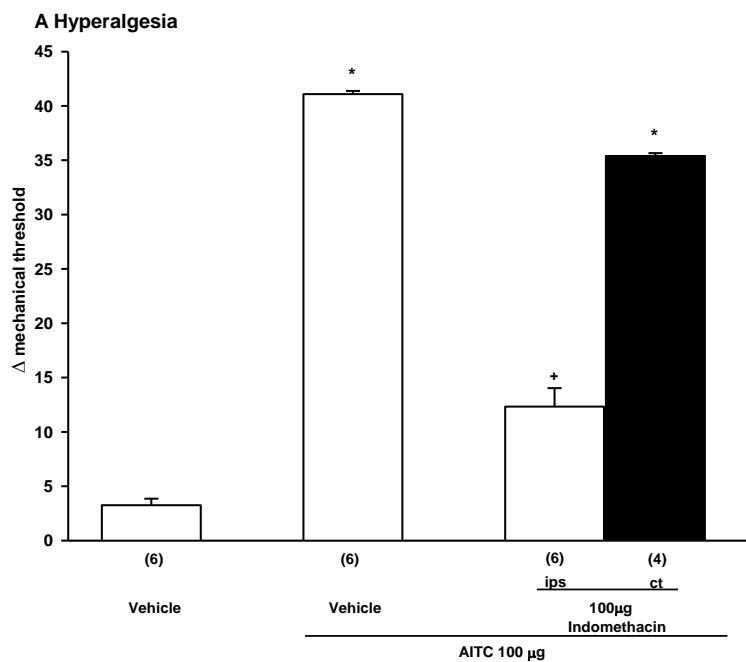
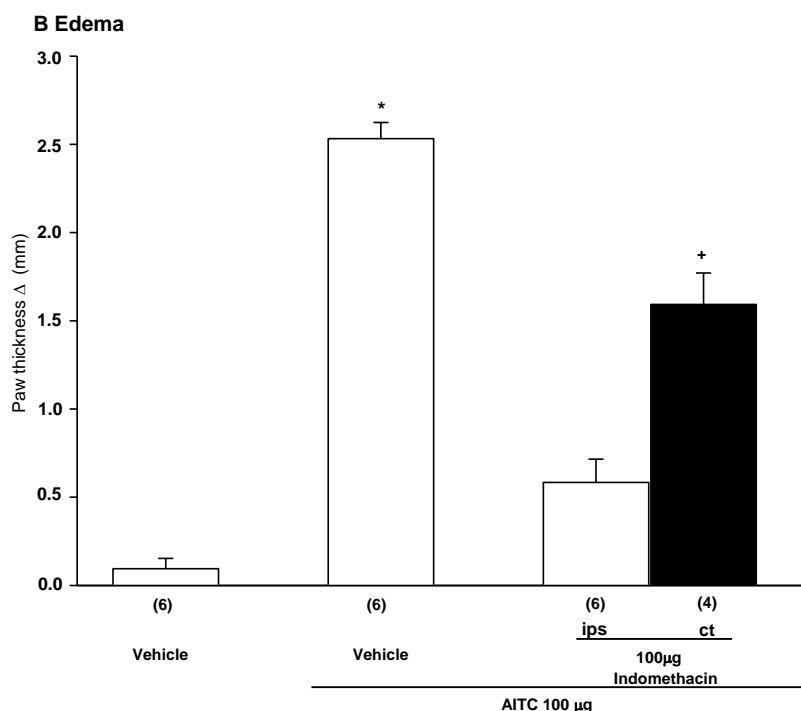


Figure 6: AITC-induced responses are significantly decreased by cyclooxygenase inhibition. A. Hyperalgesia: Ipsi- but not contralateral administration of indomethacin significantly decreased AITC-induced hyperalgesia (One way Anova, and Tukey test, $P > 0.05$). The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups, “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. Indomethacin = COX2 inhibitor.



B. Edema: Ipsi- and contralateral administration of indomethacin significantly decreased AITC-induced edema (One way Anova, and Tukey test, $P > 0.05$). The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups, “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. Indomethacin = COX2 inhibitor.

7. SYMPATHETIC NERVOUS SYSTEM AND NOREPINEPHRINE CONTRIBUTE TO HYPERALGESIA AND EDEMA INDUCED BY TRPA1 ACTIVATION.

The involvement of the sympathetic nervous system and norepinephrine in AITC-induced hyperalgesia and edema was assessed by evaluating the effect of the pretreatment with guanethidine (30mg/kg three daily s.c. injections), which depletes norepinephrine from sympathetic postganglionic terminals, or by co-treatment with atenolol (6 μg/paw), a β₁ adrenergic receptor antagonist or with ICI 118,551 (1.5 μg/paw), a β₂ receptor adrenergic antagonist.

As shown in Figure 7A, AITC-induced hyperalgesia was significantly decreased either by co-treatment with atenolol or ICI 118,551 into the ipsi- but not contralateral hind paw or by pretreatment with guanethidine (One-Way ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$). These findings indicate that sympathetic

nervous system and norepinephrine contribute to TRPA1-mediated hyperalgesia.

As shown in Figure 7B, AITC-induced edema was significantly decreased by co-treatment with atenolol or ICI 118,551 or by pretreatment with guanethidine (Figure 7A, One-Way ANOVA and Tukey test, $p < 0.05$). Both antagonists decreased paw edema when applied on the contralateral paw, suggesting a low systemic absorption. These findings indicate that sympathetic nervous system and norepinephrine contribute to TRPA1-mediated hyperalgesia and edema.

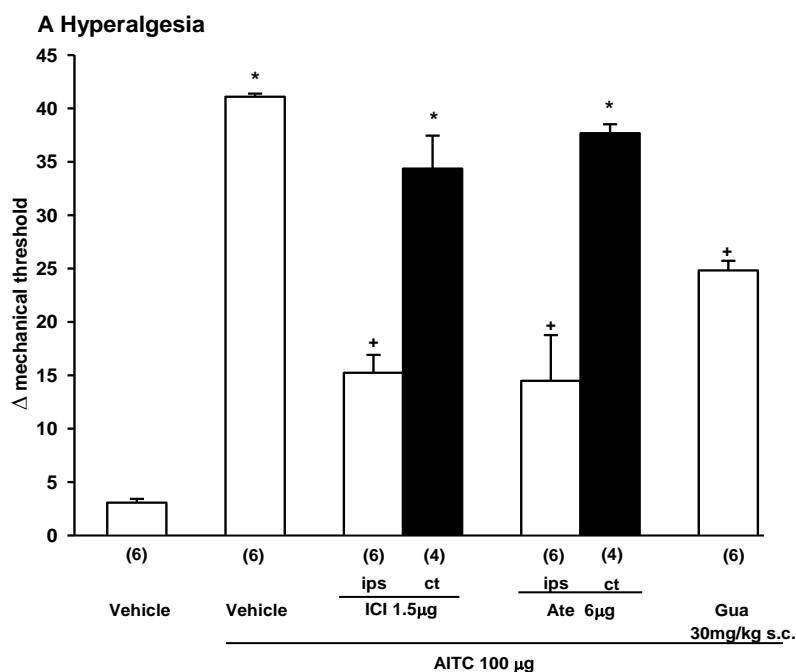
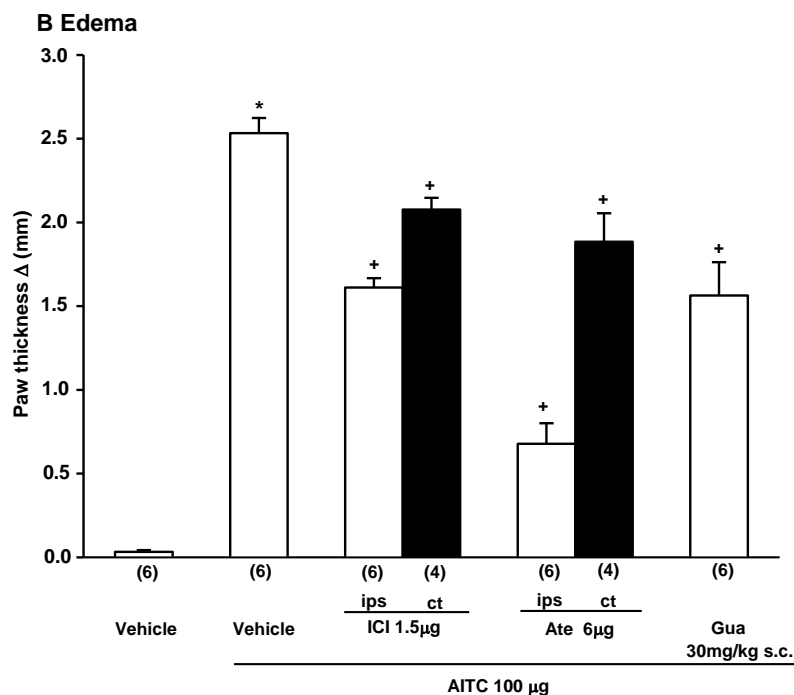


Figure 7: AITC-induced responses are significantly decreased by the pharmacological blockade of beta adrenergic receptors or depletion of sympathetic nervous terminals. A. Hyperalgesia. Ipsi-, but not contralateral administration of ICI or atenolol or pretreatment with guanethidine significantly decreased AITC-induced hyperalgesia (One way Anova, and Tukey test, $P > 0.05$). The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups, “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. Gua = Guanethidine, depletor of sympathetic nervous terminals; ICI= ICI 118,551 β_2 adrenergic receptor antagonist; Ate = Atenolol, β_1 adrenergic receptor antagonist



B.Edema. Ipsi- and contralateral administration of atenolol or ICI or pretreatment with guanethidine significantly decreased AITC-induced edema (One way Anova, and Tukey test, $P > 0.05$). The symbols “*” indicate a response significantly higher than that of the other groups, “+” indicate a response significantly higher than that induced by vehicle. Gua = Guanethidine, depletor of sympathetic nervous terminals; ICI= ICI 118,551 β_2 adrenergic receptor antagonist; Ate = Atenolol, β_1 adrenergic receptor antagonist.

DISCUSSION

Data obtained from this study converge to indicate that the role of TRPA1 in pain and inflammation extends its well known function in neuronal excitability. We showed that TRPA1 activation induces inflammatory hyperalgesia and edema through multiple inflammatory mechanisms such as (a) neuropeptides release; (b) mast cell degranulation and the consequent release of their major mediators, histamine and 5-HT; (c) neutrophil migration and (d) the local formation of prostaglandins and release of norepinephrine. Previous literature data have demonstrated the involvement of neuropeptides and mast cells in TRPA1-mediated nociception and edema (TREVISANI et al., 2007; ANDRADE et al., 2008; GRAEPEL et al., 2011), therefore the present findings largely extend them, constructing a new picture of the TRPA1 function in nociceptive and inflammatory mechanisms.

As a cation channel previously thought to be primarily expressed in nociceptors, the expected consequence of TRPA1 gating is action potential generation leading to overt nociception and neurogenic inflammation. However, recent evidence suggest that TRPA1 activation also sensitizes nociceptors, lowering the stimulus threshold for firing an action potential (TREVISANI et al., 2007; DUNHAM et al., 2008; GRAEPEL et al., 2011; ROBERTS et al., 2011; NAKAMURA et al., 2012). Here we characterized *in vivo* the nociceptor sensitization induced by TRPA1 activation by measuring the hyperalgesic response induced by its agonist, AITC, during thirty hours and by evaluating the effect of pharmacological and genetic blockade of TRPA1 function on this response. AITC induced an evident dose- and time-dependent decrease in paw-withdraw threshold, defined as hyperalgesia, which was maximal three and was still present thirty hours after injection (Figure 1 A). AITC-induced mechanical hyperalgesia depends on TRPA1 activation, since it was blocked by the pharmacological blockade of TRPA1 or by its neuronal gene silencing with antisense-ODN (Figure 2 A). These findings extend previous data that TRPA1 agonists induce hyperalgesia (TREVISANI et al., 2007; DUNHAM et al., 2008; GRAEPEL et al., 2011; ROBERTS et al., 2011; NAKAMURA et al., 2012) by showing that the hyperalgesic response is surprisingly long-lasting and dependent of neuronal TRPA1 receptors, since it was blocked by treatment with antisense-ODN. This last finding is of special interest and worthy of caution interpretation. Recently, we have demonstrated that the selective blockade of TRPA1 expression with antisense-ODN prevented carrageenan- or prostaglandin E₂-induced hyperalgesia (BONET et al., 2012; DALL'ACQUA et al., 2012)*. Except for one article, in which antisense-ODN did not decrease either mechanical hyperalgesia or basal TRPA1 expression (OBATA et al., 2005), similar findings have been obtained by other authors using different models (KATSURA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008; YANG et al., 2008; DA COSTA et al., 2010; OKUBO et al., 2012). Altogether, these data consistently demonstrate that the knocking down of neuronal TRPA1 expression hampers nociceptor sensitization independent of the model or of the stimulus (mechanical or thermal) used. In fact, directly-acting hyperalgesic mediators increase neuronal membrane excitability by activating their receptors to initiate signaling pathways known to activate TRPA1 (BANDELL et al., 2004; DAI et al.,

2007; WANG et al., 2008). Therefore, TRPA1 activation downstream these pathways could contribute, in an essential way, to increase membrane excitability and, consequently, to sensitize nociceptors. This, however, does not exclude the possibility that TRPA1 activity away from sensory nerves indirectly contribute to nociceptor sensitization.

A double role of TRPA1 in orchestrating neuronal and non-neuronal inflammatory mechanisms is evident when we analyze TRPA1-mediated edema. AITC induced a significant dose- and time-dependent increase in paw thickness, used as a measure of edema, in the first six hours after its injection (Figure 1 B). AITC- induced edema was blocked by treatment with the TRPA1 antagonist and significantly decreased by that with antisense-ODN (Figure 2 B). Since the antagonist blocks TRPA1 in any of the TRPA1 expressing cells, while antisense-ODN selectively blocks its neuronal expression, these findings indicate that activation of neuronal TRPA1 contributes only partially to AITC-induced edema. These findings are to be expected because in contrast to nociceptor sensitization, which is a neuronal phenomena modulated by non-neuronal mechanisms, edema is a nonspecific tissue reaction influenced by a variety of inflammatory mechanisms (DVORAK, 2010).

A well known consequence of TRPA1 activation on sensory nerves is the peripheral release of neuropeptides, such as substance P and CGRP, which contribute to TRPA1-mediated nociception (ANDRADE et al., 2008; NAKAMURA et al., 2012) and edema (TREVISANI et al., 2007; NAKAMURA et al., 2012). Here we confirm the involvement of neuropeptides in TRPA1-mediated edema and showed that they also contribute to TRPA1-mediated mechanical inflammatory hyperalgesia. This was evidenced by findings showing that the pharmacological blockade of the NK1 receptor, the high-affinity receptor for substance P, or of the CGRP receptor, significantly decreased AITC-induced hyperalgesia and edema (Figure 3). These findings suggest that substance P and CGRP play an important role in TRPA1-mediated hyperalgesia and edema, without exclude, however, the involvement of other tachykinins because neurokinin A and B can also interact with NK1 receptor (MUSSAP et al., 1993; REGOLI et al., 1994). Substance P and CGRP released in peripheral tissues from primary afferents contribute to inflammatory pain and lead to neurogenic inflammation by triggering multiple inflammatory mechanisms (SZAREK et al.,

1998; LIU et al., 2011). Among them, mast cell degranulation is prominent and was previously associated to TRPA1-mediated nociception (ANDRADE et al., 2008). This study demonstrated that mast cell and their major mediators histamine and 5-HT also contributes to TRPA1 mediated hyperalgesia and edema. Previous degranulation of mast cells, by treatment with compound 48/80, or the co-administration of a H1, of a 5-HT_{1A} or of a 5-HT₃ receptor antagonist efficiently reduced AITC-induced hyperalgesia and edema (Figure 4). Mast cells express both NK1 (OKADA et al., 1999) and TRPA1 (PRASAD et al., 2008) receptors, therefore TRPA1-mediated mast cell degranulation probably results from TRPA1 activation in either mast cells and in primary nociceptors (via neuropeptides release). Anyway, the present findings suggest that hyperalgesia and edema induced by TRPA1 activation is mediated, at least in part, by release of neuropeptides from the primary nociceptive neurons and histamine and 5-HT from mast cells.

Neutrophils play a central role in inflammatory mechanisms, their interaction in the site of inflammation with resident cells and local inflammatory mediators amplify the inflammatory response, contributing to the release of nociceptive mediators (CUNHA et al., 2008) and edema formation (LO et al., 1999). Although it was already known that TRPA1 agonists are able to induce neutrophil migration (BANVOLGYI et al., 2004), it was not known whether neutrophil migration contributes to TRPA1-mediated hyperalgesia and edema. In the present study, fucoidan was used as a pharmacological tool to investigate this issue, since it binds to L- and P-selectins and consequently, inhibits neutrophil rolling (LEY et al., 1993; CUNHA et al., 2008). Pretreatment with fucoidan significantly decreased AITC-induced hyperalgesia and edema (Figure 5), showing that neutrophils also contribute to TRPA1-mediated hyperalgesia and edema. Although the mechanisms underlying neutrophil migration in response to local TRPA1 activation are not known, many of the TRPA1-mediated mechanisms could contribute to that. For example, it was demonstrated that activation of TRPA1 in keratinocytes induces the release of pro-inflammatory cytokines (ATOYAN et al., 2009) known to be key contributors to neutrophil migration. In addition, exogenous administered neuropeptides induce neutrophil migration (KAHLER et al., 2001), however, their endogenous release appear do not contribute to neutrophil migration induced by TRPA1

agonists (BANVOLGYI et al., 2004). Further studies are needed to evaluate a possible direct effect mediated by TRPA1 in recruited neutrophils, so far, it is still undefined whether or not TRPA1 is expressed in neutrophils.

Prostaglandins and norepinephrine are the most important direct-acting mediators ultimately responsible for nociceptor sensitization (TONUSSI; FERREIRA, 1994; KHASAR et al., 1999; VERRI et al., 2006). They also have actions in inflammatory reactions and edema formation (CLAUDINO et al., 2006; XU et al., 2010). This study demonstrates that the hyperalgesia and edema induced by TRPA1 activation are mediated by prostaglandins and norepinephrine. The involvement of prostaglandins was demonstrated by the ability of indomethacin, a cyclooxygenase inhibitor, to significantly reduce AITC-induced hyperalgesia and edema (Figure 6). In an inflamed site, there are several potential sources for prostaglandins synthesis; therefore TRPA1 activation could contribute to that by regulating different mechanisms. For example, by inducing neutrophil migration, since these cells play a key role in prostaglandin synthesis and nociceptor sensitization (CUNHA et al., 2008). In addition, it was demonstrated that activation of TRPA1 in fibroblasts and keratinocytes induces the synthesis of prostaglandin E₂ (JAIN et al., 2011). The involvement of norepinephrine in TRPA1-mediated hyperalgesia and edema was demonstrated by the ability of both β -1 and β -2 adrenoceptor antagonists, atenolol and ICI 118,551, respectively, to significantly reduce AITC-induced hyperalgesia and edema (Figure 7). The source of norepinephrine release could be post-ganglionic sympathetic terminals, since the mRNA for TRPA1 is found in these neurons (SMITH et al., 2004). This possibility was supported by our findings showing that depletion of norepinephrine in the sympathetic terminals by guanethidine also reduce AITC-induced hyperalgesia and edema (Figure 7). Taken together these findings suggest that TRPA1 activation during inflammation induces the synthesis of prostaglandins and the release norepinephrine to contribute to inflammatory reaction and nociceptor sensitization.

In summary, by using AITC as a pharmacological tool to study the mechanisms underlying TRPA1-mediated hyperalgesia and edema, we provided evidences that TRPA1 activation contributes to some of the major inflammatory events. As a sensor of chemical damage, TRPA1 can be activated

by surprisingly diverse mechanisms. This gating promiscuity allows that diverse local mediators released during inflammation are able to activate TRPA1 in any of the TRPA1 expressing cells. Therefore, based on the present findings, we suggest that TRPA1 activity away from sensory nerves indirectly contributes to pain and inflammation. This, however, does not diminish the imperative importance of neuronal TRPA1. On the contrary, we suggest that TRPA1 is a key receptor in inflammatory and nociceptive mechanisms, mediating both the release and the effect of diverse inflammatory mediators. For example, TRPA1 activation appears to contribute both to the synthesis (as suggested in the present study) and to the hyperalgesic effect (DALL'ACQUA et al., 2012) of prostaglandins, which can be considered the major mediators of inflammatory pain, as supported by the analgesic properties of COX inhibitors (Ferreira et al. 1973). Therefore, TRPA1 blockade is a promising strategy for the development of future drugs for treatment and control of inflammatory pain.

5 DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste estudo indicam que o papel do TRPA1 na dor e inflamação vai além de sua conhecida função na excitabilidade neuronal. Os dados obtidos demonstram que o TRPA1 contribui para a hiperalgesia e para a inflamação *in vivo* regulando múltiplos mecanismos inflamatórios. Essa ideia é suportada pelos resultados que mostram que a hiperalgesia e edema induzidos por um agonista TRPA1 é mediada por neuropeptídeos; degranulação de mastócitos e consequente liberação de seus principais mediadores, histamina e 5-HT; migração de neutrófilos e liberação de mediadores inflamatórios como prostaglandinas e norepinefrina. Dados prévios da literatura demonstraram o envolvimento de neuropeptídeos e de mastócitos na nocicepção e edema mediados pelo TRPA1 (TREVISANI et al., 2007; ANDRADE et al., 2008; GRAEPEL et al., 2011), portanto os nossos dados vão mais além, construindo uma nova imagem da função do TRPA1 em mecanismos nociceptivos e inflamatórios.

Sendo um canal de cátions que se pensava ser expresso primariamente em neurônios nociceptivos primários, a consequência esperada após a ativação do TRPA1 é a geração do potencial de ação levando a nocicepção e inflamação neurogênica. No entanto, evidências recentes sugerem que a ativação do TRPA1 também sensibiliza nociceptores, baixando o limiar de estímulo para disparar um potencial de ação (TREVISANI et al., 2007; DUNHAM et al., 2008; GRAEPEL et al., 2011; ROBERTS et al., 2011; NAKAMURA et al., 2012). Aqui nós avaliamos a sensibilização do nociceptor mediada pelo TRPA1 através da avaliação da resposta hiperalgésica induzida pelo seu agonista, AITC, durante 30 horas. O AITC induziu redução evidente no limiar de retirada da pata, referida como hiperalgesia mecânica, de forma dose e tempo-dependente. A resposta hiperalgésica foi máxima na terceira hora e ainda estava presente trinta horas após a injeção (Figura 1 A). A hiperalgesia induzida pelo AITC depende do TRPA1, pois foi inibida pelo bloqueio farmacológico do TRPA1 ou pelo silenciamento neuronal de gene,

com ODN-antisense (Figura 2 A). Esses resultados confirmam dados prévios de que agonista de TRPA1 induz hiperalgesia (TREVISANI et al., 2007; DUNHAM et al., 2008; GRAEPEL et al., 2011; ROBERTS et al., 2011; NAKAMURA et al., 2012) e vão além, mostrando que a resposta hiperalgésica é surpreendentemente longa e dependente de TRPA1 neuronal, uma vez que é bloqueado pelo ODN-antisense. Esse último resultado é de especial interesse e digno de interpretação cautelosa. Recentemente nós mostramos que o bloqueio seletivo da expressão do TRPA1 com ODN-antisense preveniu a hiperalgesia induzida por carragenina ou por prostaglandina E₂ (BONET et al., 2012; DALL'ACQUA et al., 2012). Resultados similares aos nossos vêm sendo obtidos por outros autores, utilizando diferentes modelos experimentais (KATSURA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008; YANG et al., 2008; DA COSTA et al., 2010; OKUBO et al., 2012). Encontramos somente um artigo em que o tratamento com antisense não reduziu a hiperalgesia mecânica e térmica ao calor, tendo reduzido somente a hiperalgesia térmica ao frio induzida pela administração de CFA ou por lesão neural (OBATA et al., 2005). Esse resultado poderia ser atribuído ao fato de que, nesse estudo, o antisense não reduziu a expressão basal de TRPA1 em comparação com o grupo controle, tendo unicamente impedido que o CFA e a neuropatia aumentassem a expressão do TRPA1. Portanto, juntos, os dados obtidos no presente estudo e aqueles obtidos anteriormente, em nosso laboratório (BONET et al., 2012; DALL'ACQUA et al., 2012) ou por outros pesquisadores (KATSURA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008; YANG et al., 2008; DA COSTA et al., 2010; OKUBO et al., 2012) sugerem um papel essencial do TRPA1 neuronal no processo de sensibilização do nociceptor primário. Isso é demonstrado pelo fato de que ao se diminuir seletivamente a expressão do TRPA1 em neurônios aferentes primários se impede a sensibilização dos mesmos, independente do modelo ou estímulo (mecânico ou térmico) utilizado para evidenciá-la. Portanto a ativação do receptor TRPA1 localizado nos nociceptores primários deve contribuir, de maneira essencial, para aumentar a excitabilidade da membrana, e conseqüentemente, para sensibilizar o do nociceptor.

No entanto, a importante participação do TRPA1 expresso em neurônios aferentes primários na hiperalgesia inflamatória não exclui sua participação em mecanismos inflamatórios não neuronais. Um duplo papel do

TRPA1 mediando mecanismos inflamatórios neuronais e não neuronais é mais evidente quando analisamos o edema induzido pela ativação do TRPA1. O AITC induziu um significativo aumento na espessura da pata, utilizado como medida do edema, de forma dose e tempo-dependente, nas primeiras seis horas após sua injeção (Figura 1 B). O edema induzido por AITC foi bloqueado pelo tratamento com antagonista de TRPA1 e significativamente diminuído pelo tratamento com ODN-antisense (Figura 2 B). Levando-se em consideração que o antagonista é capaz de bloquear o TRPA1 em qualquer célula que o expresse, enquanto que o ODN-antisense bloqueia seletivamente sua expressão neuronal, esses resultados indicam que o TRPA1 media mecanismos neuronais que contribuem parcialmente para a formação do edema induzido pelo AITC. Esses resultados não são surpreendentes porque ao contrário da sensibilização do nociceptor, que é um processo neuronal que pode ser parcialmente modulado por mecanismos não neuronais, o edema é uma reação tecidual não específica influenciada por uma enorme variedade de mecanismos inflamatórios (DVORAK, 2010).

Uma conhecida consequência da ativação do TRPA1 nos nervos sensoriais é a liberação periférica de neuropeptídeos, como SP e CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina). Esses neuropeptídeos, ao se ligarem aos seus respectivos receptores, iniciam uma série de respostas locais que caracterizam o componente neurogênico da inflamação (LEVINE et al., 2006). Já foi demonstrado que a liberação de neuropeptídeos como a SP e o CGRP contribuem para a nocicepção (ANDRADE et al., 2008; NAKAMURA et al., 2012) e edema (TREVISANI et al., 2007; NAKAMURA et al., 2012) induzidos pela ativação do TRPA1. Aqui nós confirmamos o envolvimento dos neuropeptídeos no edema mediado pelo TRPA1 e mostramos que eles também contribuem para a hiperalgesia mecânica inflamatória mediada pelo TRPA1. Isso foi evidenciado através de resultados que mostram que o bloqueio farmacológico do receptor NK1, o receptor de maior afinidade para a substância P, ou do receptor CGRP, reduziu significativamente a hiperalgesia e o edema (Figura 3) induzidos pelo AITC. Obviamente, esses resultados não excluem o envolvimento de outras taquicininas na hiperalgesia e edema mediados pelo TRPA1, uma vez que as neurocininas A e B podem também interagir com o receptor NK1 (MUSSAP et al., 1993; REGOLI et al., 1994).

A substância P e o CGRP liberados nos tecidos periféricos pelos aferentes primários levam à inflamação neurogênica e contribuem para a dor inflamatória ao desencadear múltiplos mecanismos inflamatórios (SZAREK et al., 1998; LIU et al., 2011). Outro efeito local mediado pelos neuropeptídeos é a degranulação de mastócitos e a consequente liberação de histamina e 5-HT. Os mastócitos são leucócitos densamente granulares que residem nos tecidos e que podem liberar um espectro variável de mediadores pró-inflamatórios em resposta a uma variedade de estímulos. Dentre esses mediadores, incluem-se os pré-formados, como 5-HT, histamina e proteases; e os de síntese sob demanda, como leucotrienos, prostaglandinas, citocinas e quimiocinas (EDWARDS, 2008). Juntos esses mediadores exercem diversos efeitos pró-inflamatórios sobre os tecidos. Dentre os mediadores inflamatórios liberados pelos mastócitos, sabe-se que a histamina e a 5-HT atuam diretamente nos nociceptores através da ligação com seus respectivos receptores que são expressos nos neurônios aferentes primários (KASHIBA et al., 2001; TAMBELI et al., 2006). Nesse estudo, utilizamos composto 48/80 como ferramenta farmacológica para avaliar a contribuição dos mastócitos na hiperalgesia e edema induzidos pelo AITC. Estudos prévios demonstram que a degranulação de mastócitos promovida pelo composto 48/80 é do tipo não citotóxica, promovendo a liberação de seus mediadores inflamatórios com a manutenção da integridade das membranas (BUNDOC; KEANE-MYERS, 2007). A confirmação de que no momento do experimento todos os mastócitos locais estavam previamente degranulados foi obtida ao comparar a resposta nociceptiva induzida por uma única injeção de 10 µg de composto 48/80, com aquela induzida pelo mesmo tratamento em animais submetidos ao protocolo de degranulação de mastócitos (injeções intraplantares diárias com doses crescentes, 1, 3, 10 ou 10 µg, de composto 48/80). A ausência de resposta nociceptiva no último grupo é um indicativo de que os mastócitos locais estavam completamente degranulados no momento do experimento. A degranulação de mastócitos também já foi previamente associada com a nocicepção induzida pela ativação do TRPA1 (ANDRADE et al., 2008). O presente estudo vai bastante além desses dados demonstrando que os mastócitos e seus principais mediadores, histamina e 5-HT, também contribuem para a hiperalgesia e edema induzidos pela ativação do TRPA1.

Isso foi evidenciado através de resultados que mostram que o tratamento com composto 48/80 ou a co-administração de antagonista para os receptores H_1 , $5-HT_{1A}$ e $5-HT_3$, reduziu significativamente tanto a hiperalgesia (Figura 4 A) quanto o edema (Figura 4 B) induzidos pelo AITC. Os mastócitos expressam tanto receptores NK1 (OKADA et al., 1999) quanto TRPA1 (PRASAD et al., 2008), portanto a degranulação de mastócitos mediada pelo TRPA1 provavelmente é resultado da ativação do TRPA1 diretamente em mastócitos e nos nociceptores primários, que ao liberarem neuropetídeos contribuem indiretamente para a degranulação mastocitária. De qualquer maneira, esses resultados sugerem que a hiperalgesia e o edema induzidos pela ativação do TRPA1 é mediado, pelo menos em parte por um mecanismo que depende de prévia liberação de neuropeptídeos dos neurônios nociceptivos primários e de histamina e 5-HT provenientes da degranulação de mastócitos. Foi sugerido em um artigo de nosso grupo (FISCHER et al., 2008), que o TRPA1 atua como um receptor chave na manutenção de um ciclo relacionado a dor inflamatória. A lesão tecidual e a conseqüente liberação de substâncias inflamatórias, como histamina, 5-HT e agonistas endógenos do TRPA1, induz a ativação do receptor TRPA1 que, além de ativar o nociceptor periférico, promove a liberação de neuropeptídeos que contribuem para aumentar a liberação de substâncias inflamatórias e a lesão tecidual, mantendo a ativação do receptor TRPA1.

Os neutrófilos têm um papel central nos mecanismos inflamatórios, sua interação, no sítio da inflamação, com as células residentes e mediadores inflamatórios locais amplifica a resposta inflamatória (CUNHA et al., 2008) contribuindo para a formação do edema (LO et al., 1999) e para a liberação de mediadores nociceptivos. Embora já se saiba que agonistas de TRPA1 são capazes de induzir migração de neutrófilos (BANVOLGYI et al., 2004), não se sabe se a migração de neutrófilos contribui para a hiperalgesia e edema induzidos pela ativação do TRPA1. Nesse estudo, fucoidan foi utilizado como uma ferramenta farmacológica para investigar essa questão, uma vez ao se ligar as selectinas L e P, impede o processo de rolamento dos neutrófilos (LEY et al., 1993; CUNHA et al., 2008). O pré-tratamento com fucoidan reduziu significativamente a hiperalgesia (Figura 5 A) e o edema (Figura 5 B) induzidos pelo AITC, mostrando que os neutrófilos têm um importante papel nessas

respostas mediadas pelo TRPA1. Embora os mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos em resposta a ativação de TRPA1 local não sejam bem conhecidos, muitos mecanismos poderiam contribuir para isso. Por exemplo, foi demonstrado que a ativação de TRPA1 em queratinócitos induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias (ATOYAN et al., 2009) conhecidas por induzirem migração de neutrófilos. No entanto, embora a administração exógena de neuropeptídeos induza migração de neutrófilos (KAHLER et al., 2001), eles parecem não contribuir para migração de neutrófilos induzida por agonistas de TRPA1 (BANVOLGYI et al., 2004). Portanto, o envolvimento de TRPA1 neuronal na migração de neutrófilos induzida pelo AITC é pouco provável. Mais estudos são necessários para avaliar um possível efeito direto do TRPA1 no recrutamento de neutrófilos, uma vez que, até agora, não está determinado se o TRPA1 é ou não expresso em neutrófilos.

Prostaglandinas e norepinefrina são os mais importantes mediadores de ação direta, em última instância, responsáveis pela sensibilização do nociceptor primário (TONUSSI; FERREIRA, 1994; KHASAR et al., 1999; VERRI et al., 2006). Esses mediadores, ao ativar seus respectivos receptores acoplados a proteína G iniciam vias de sinalização celular, como a via da PLC e da adenilato ciclase, para induzir uma série de mudanças bioquímicas, como aumento dos níveis de cálcio citosólicos, fechamento de canais de potássio e aumento da permeabilidade ou da expressão de alguns canais de sódio na membrana do neurônio, que contribuem para o processo de sensibilização da fibra nociceptiva. É importante salientar que a ativação do TRPA1 provavelmente figura entre os mecanismos que contribuem para a sensibilização dos neurônios nociceptivos. Isso porque já foi demonstrado que mediadores inflamatórios que iniciam vias de sinalização celular como a via da PLC e da adenilato ciclase ativam o TRPA1 (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006; DAI et al., 2007; WANG et al., 2008). De fato, um estudo recente de nosso grupo demonstra que a hiperalgesia induzida pela PGE₂ depende da ativação do TRPA1 e que essa ativação é mediada pela PKA e PKC. Além de seu importante papel na sensibilização dos neurônios nociceptivos primários, as prostaglandinas e norepinefrina também têm ações na reação inflamatória e formação de edema (CLAUDINO et al., 2006; XU et al., 2010). Esse estudo demonstrou que a hiperalgesia e o edema induzidos pela ativação do TRPA1

são mediados por prostaglandinas e norepinefrina. O envolvimento das prostaglandinas foi demonstrado através da habilidade da indometacina, um inibidor de ciclooxigenase, em reduzir significativamente a hiperalgesia (Figura 6 A) e o edema (Figura 6 B) induzidos pelo AITC. Existem várias fontes potenciais para síntese de prostaglandinas em um tecido inflamado, dentre eles os neutrófilos têm um importante papel na síntese de prostaglandinas e na sensibilização do nociceptor (CUNHA et al., 2008). E como demonstrado nesse estudo e discutido anteriormente, os neutrófilos contribuem para a hiperalgesia e o edema induzidos pela ativação do TRPA1, portanto, poderiam contribuir para a produção de prostaglandinas em resposta a ativação do TRPA1. Além disso, foi demonstrado que a ativação do TRPA1 em queratinócitos e fibroblastos induz a liberação de eicosanóides como a prostaglandina E2 e LTB₄ (JAIN et al., 2011). O envolvimento da norepinefrina na hiperalgesia e edema induzidos pela ativação do TRPA1 foi demonstrado através da habilidade de antagonistas de receptores β_1 e β_2 adrenérgicos, atenolol e ICI 118,551, respectivamente, em reduzir significativamente a hiperalgesia (Figura 7 A) e edema (Figura 7 B) induzidos pelo AITC. A fonte de liberação de norepinefrina pode ser os terminais simpáticos pós-ganglionares, pois o RNAm para TRPA1 foi encontrado nesses neurônios (SMITH et al., 2004). Essa possibilidade é suportada por nossos resultados mostrando que a depleção de norepinefrina nos terminais simpáticos, através do tratamento com guanetidina, também reduz a hiperalgesia (Figura 7 A) e edema (Figura 7 B) induzidos pelo AITC. Em conjunto esses dados sugerem que a ativação do TRPA1 durante o dano tecidual e inflamação induz a liberação de prostaglandinas e norepinefrina que contribuem para a reação inflamatória e sensibilização do nociceptor.

Uma vez que o TRPA1 é um receptor envolvido na detecção de estímulos ambientais nocivos, ele pode ser ativado por mecanismos surpreendentemente diversos. Essa promiscuidade do canal permite que diversos mediadores locais liberados durante a inflamação sejam capazes de ativar o TRPA1 em qualquer célula que o expresse. Utilizando o AITC como ferramenta farmacológica para estudar os mecanismos envolvidos na hiperalgesia e edema mediados pelo TRPA1, nós fornecemos evidências de que o TRPA1 media alguns dos principais eventos inflamatórios. Baseado nesses dados, nós sugerimos que a atividade do TRPA1 fora dos nervos

sensoriais contribui indiretamente para a dor e inflamação. Isso, contudo, não diminui a importância fundamental do TRPA1 neuronal contribuindo diretamente para a sensibilização do nociceptor e para a inflamação neurogênica. Pelo contrário, nós sugerimos que o TRPA1 é um receptor chave nos mecanismos inflamatórios e nociceptivos, operando um ciclo no qual, mediadores liberados durante a inflamação ativam o TRPA1 - em qualquer célula que o expresse - e a ativação do TRPA1 induz a liberação de mais mediadores inflamatórios. Por exemplo, se considerarmos as prostaglandinas - um dos os principais mediadores da dor inflamatória, de acordo com a eficácia analgésica dos AINEs - esse estudo sugere que a ativação do TRPA1 induz a formação local de prostaglandinas, e, como mencionado, um estudo anterior de nosso laboratório demonstra que a ativação do TRPA1 em neurônios aferentes primários é essencial para a hiperalgesia induzida pela PGE₂ (DALL'ACQUA et al., 2012). Portanto, a ativação do TRPA1 parece contribuir tanto para a formação de prostaglandina quanto para sua ação no neurônio aferente primário.

Evidentemente, há um longo caminho a ser percorrido e muitos estudos ainda são necessários para avaliar o potencial terapêutico de fármacos que bloqueiem o TRPA1. No entanto, em uma primeira análise as vantagens desses fármacos sobre os tradicionais AINEs são evidentes. Primeiramente por que seu uso não estaria associado aos efeitos colaterais gastrointestinais, uma vez que a síntese de PGs protetoras da mucosa gástrica estaria preservada. Outro fato, é que o mecanismo de ação de um fármaco que bloqueie o receptor TRPA1 não se restringiria a inibição da ação algésica de mediadores formados pela ciclooxigenase. Isso é clinicamente relevante porque o TRPA1 pode ser ativado por múltiplos mecanismos associados a inflamação, conforme os dados apresentados neste trabalho. Juntas, essas evidências sugerem que o TRPA1 é um receptor chave para os mecanismos inflamatórios e nociceptivos e, portanto, poderia ser um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos clinicamente relevantes para o tratamento e controle da dor inflamatória.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON, D. A.;GENTRY, C.;MOSS, S.;BEVAN, S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. **J .Neurosci.**, v.28, p.2485–2494. 2008.

ANDRADE, E. L.;LUIZ, A. P.;FERREIRA, J.;CALIXTO, J. B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**, v.152, n.2, Mar 18, p.511-20. 2008.

ATOYAN, R.;SHANDER, D.;BOTCHKAREVA, N. V. Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. **J Invest Dermatol**, v.129, n.9, Sep, p.2312-5. 2009.

BANDELL, M.;STORY, G. M.;HWANG, S. W.;VISWANATH, V.;EID, S. R.;PETRUS, M. J.;EARLEY, T. J.;PATAPOUTIAN, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, v.41, n.6, Mar 25, p.849-57. 2004.

BANVOLGYI, A.;POZSGAI, G.;BRAIN, S. D.;HELYES, Z. S.;SZOLCSANYI, J.;GHOSH, M.;MELEGH, B.;PINTER, E. Mustard oil induces a transient receptor potential vanilloid 1 receptor-independent neurogenic inflammation and a non-neurogenic cellular inflammatory component in mice. **Neuroscience**, v.125, n.2, p.449-59. 2004.

BARRERA, P.;VAN DER MAAS, A.;VAN EDE, A. E.;KIEMENEY, B. A.;LAAN, R. F.;VAN DE PUTTE, L. B. Drug survival, efficacy and toxicity of monotherapy with a fully human anti-tumour necrosis factor-alpha antibody compared with methotrexate in long-standing rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v.41, p.430-439. 2002.

BASBAUM, A. I.;BAUTISTA, D. M.;SCHERRER, G.;JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v.139, n.2, Oct 16, p.267-84. 2009.

BAUTISTA, D. M.;JORDT, S. E.;NIKAI, T.;TSURUDA, P. R.;READ, A. J.;POBLETE, J.;YAMOAH, E. N.;BASBAUM, A. I.;JULIUS, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**, v.124, n.6, Mar 24, p.1269-82. 2006.

BAUTISTA, D. M.;MOVAHED, P.;HINMAN, A.;AXELSSON, H. E.;STERNER, O.;HOGESTATT, E. D.;JULIUS, D.;JORDT, S. E.;ZYGMUNT, P. M. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, n.34, Aug 23, p.12248-52. 2005.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v.353, n.9164, May 8, p.1610-5. 1999.

BEVAN, S.;ANDERSSON, D. A. TRP channel antagonists for pain--opportunities beyond TRPV1. **Curr Opin Investig Drugs**, v.10, n.7, Jul, p.655-63. 2009.

BOERS, M.;KOSTENSE, P. J.;VERHOEVEN, A. C.;VAN DER LINDEN, S. Inflammation and damage in an individual joint predict further damage in that joint in patients with early rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v.44, n.10, Oct, p.2242-6. 2001.

BONET, I. J. M.;FISCHER, L.;PARADA, C. A.;TAMBELI, C. H. Mechanisms underlying the involvement of the transient receptor potential A 1 in the development and maintenance of carrageenan-induced hyperalgesia. 2012.

BRAIN, S. D.;GRANT, A. D. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. **Physiol Rev**, v.84, n.3, Jul, p.903-34. 2004.

BREYER, R. M.;BAGDASSARIAN, C. K.;MYERS, S. A.;BREYER, M. D. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.41, p.661-90. 2001.

BUNDOC, V. G.;KEANE-MYERS, A. IL-10 confers protection from mast cell degranulation in a mouse model of allergic conjunctivitis. **Exp Eye Res**, v.85, n.4, Oct, p.575-9. 2007.

CATERINA, M. J.;SCHUMACHER, M. A.;TOMINAGA, M.;ROSEN, T. A.;LEVINE, J. D.;JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v.389, n.6653, Oct 23, p.816-24. 1997.

CHEN, J.;ZHANG, X. F.;KORT, M. E.;HUTH, J. R.;SUN, C.;MIESBAUER, L. J.;CASSAR, S. C.;NEELANDS, T.;SCOTT, V. E.;MORELAND, R. B.;REILLY, R. M.;HAJDUK, P. J.;KYM, P. R.;HUTCHINS, C. W.;FALTYNEK, C. R. Molecular determinants of species-specific activation or blockade of TRPA1 channels. **J Neurosci**, v.28, n.19, May 7, p.5063-71. 2008.

CLAUDINO, R. F.;KASSUYA, C. A.;FERREIRA, J.;CALIXTO, J. B. Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E2-induced mouse paw edema. **J Pharmacol Exp Ther**, v.318, n.2, Aug, p.611-8. 2006.

COLLETT, B. J. Opioid tolerance: the clinical perspective. **Br J Anaesth**, v.81, n.1, Jul, p.58-68. 1998.

COREY, D. P.;GARCÍA-AÑOVEROS, J.;HOLT, J. R.;KWAN, K. Y.;LIN, S. Y.;VOLLRATH, M. A. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. **Nature**, v.432, p.723-730. 2004.

COUTAUX, A.;ADAM, F.;WILLER, J. C.;LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v.72, n.5, Oct, p.359-71. 2005.

CRUZ-ORENGO, L.;DHAKA, A.;HEUERMANN, R. J.;YOUNG, T. J.;MONTANA, M. C.;CAVANAUGH, E. J.;KIM, D.;STORY, G. M. Cutaneous nociception evoked by 15-delta PGJ2 via activation of ion channel TRPA1. **Mol Pain**, v.4, p.30. 2008.

CUNHA, T. M.;VERRI, W. A., JR.;SCHIVO, I. R.;NAPIMOGA, M. H.;PARADA, C. A.;POOLE, S.;TEIXEIRA, M. M.;FERREIRA, S. H.;CUNHA, F. Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol**, v.83, n.4, Apr, p.824-32. 2008.

DA COSTA, D. S.;MEOTTI, F. C.;ANDRADE, E. L.;LEAL, P. C.;MOTTA, E. M.;CALIXTO, J. B. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. **Pain**, v.148, n.3, Mar, p.431-7. 2010.

DAI, Y.;WANG, S.;TOMINAGA, M.;YAMAMOTO, S.;FUKUOKA, T.;HIGASHI, T.;KOBAYASHI, K.;OBATA, K.;YAMANAKA, H.;NOGUCHI, K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. **J Clin Invest**, v.117, n.7, Jul, p.1979-87. 2007.

DALL'ACQUA, M. C.;BONET, I. J. M.;ZAMPRONIO, A. R.;TAMBELI, C. H.;PARADA, C. A.;FISCHER, L. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is an essential channel to prostaglandin E2-induced nociceptor sensitization. 2012.

DOERNER, J. F.;GISSELMANN, G.;HATT, H.;WETZEL, C. H. Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. **J Biol Chem**, v.282, n.18, May 4, p.13180-9. 2007.

DU, S.;ARAKI, I.;YOSHIYAMA, M.;NOMURA, T.;TAKEDA, M. Transient receptor potential channel A1 involved in sensory transduction of rat urinary bladder through C-fiber pathway. **Urology**, v.70, n.4, Oct, p.826-31. 2007.

DUNHAM, J. P.;KELLY, S.;DONALDSON, L. F. Inflammation reduces mechanical thresholds in a population of transient receptor potential channel A1-expressing nociceptors in the rat. **Eur J Neurosci**, v.27, n.12, Jun, p.3151-60. 2008.

DVORAK, H. F. Vascular permeability to plasma, plasma proteins, and cells: an update. **Curr Opin Hematol**, v.17, n.3, May, p.225-9. 2010.

EARLEY, S.;GONZALES, A. L.;CRNICH, R. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ channels. **Circ Res**, v.104, n.8, Apr 24, p.987-94. 2009.

EDWARDS, A. The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. **Clin Exp Allergy**, v.38, n.6, Jun, p.1063-4; author reply 1064-5. 2008.

FERNANDES, E. S.;FERNANDES, M. A.;KEEBLE, J. E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. **Br J Pharmacol**, v.166, n.2, May, p.510-21. 2012.

FERREIRA, S. H.;NAKAMURA, M. I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins**, v.18, n.2, Aug, p.179-90. 1979.

FISCHER, L.;TAMBELLI, C. H.;PARADA, C. A. TRPA1-mediated nociception. **Neuroscience**, v.155, n.2, Aug 13, p.337-8. 2008.

GEPPETTI, P.;NASSINI, R.;MATERAZZI, S.;BENEMEI, S. The concept of neurogenic inflammation. **BJU Int**, v.101 Suppl 3, Mar, p.2-6. 2008.

GEPPETTI, P. H., P. **Neurogenic Inflammation**. 1996.

GRAEPEL, R.;FERNANDES, E. S.;AUBDOOL, A. A.;ANDERSSON, D. A.;BEVAN, S.;BRAIN, S. D. 4-oxo-2-nonenal (4-ONE): evidence of transient receptor potential ankyrin 1-dependent and -independent nociceptive and vasoactive responses in vivo. **J Pharmacol Exp Ther**, v.337, n.1, Apr, p.117-24. 2011.

GRATZKE, C.;WEINHOLD, P.;REICH, O.;SEITZ, M.;SCHLENKER, B.;STIEF, C. G.;ANDERSSON, K. E.;HEDLUND, P. Transient receptor potential A1 and cannabinoid receptor activity in human normal and hyperplastic prostate: relation to nerves and interstitial cells. **Eur Urol**, v.57, n.5, May, p.902-10. 2010.

GÜLER, A. D.;LEE, H.;IIDA, T.;SHIMIZU, I.;TOMINAGA, M.;CATERINA, M. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. **J. Neurosci.**, v.22, p.6408–6414. 2002.

HAYES, P.;MEADOWS, H. J.;GUNTORPE, M. J.;HARRIES, M. H.;DUCKWORTH, D. M.;CAIRNS, W. Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. **Pain**, v.88, p.205–215. 2000.

HENRY, D.;LIM, L. L.;GARCIA RODRIGUEZ, L. A.;PEREZ GUTTHANN, S.;CARSON, J. L.;GRIFFIN, M.;SAVAGE, R.;LOGAN, R.;MORIDE, Y.;HAWKEY, C.;HILL, S.;FRIES, J. T. Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. **BMJ**, v.312, n.7046, Jun 22, p.1563-6. 1996.

HINMAN, A.;CHUANG, H. H.;BAUTISTA, D. M.;JULIUS, D. TRP channel activation by reversible covalent modification. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.51, Dec 19, p.19564-8. 2006.

INOUE, T.;BRYANT, B. P. Multiple types of sensory neurons respond to irritating volatile organic compounds (VOCs): calcium fluorimetry of trigeminal ganglion neurons. **Pain**, v.117, n.1-2, Sep, p.193-203. 2005.

JAIN, A.;BRONNEKE, S.;KOLBE, L.;STAB, F.;WENCK, H.;NEUFANG, G. TRP-channel-specific cutaneous eicosanoid release patterns. **Pain**, v.152, n.12, Dec, p.2765-72. 2011.

JANCSÓ, N.;JANCSÓ-GÁBOR, A.;SZOLCSÁNYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. **Br J Pharmacol Chemother**, v.31, p.138–151. 1967.

JORDT, S. E.;BAUTISTA, D. M.;CHUANG, H. H.;MCKEMY, D. D.;ZYGMUNT, P. M.;HOGESTATT, E. D.;MENG, I. D.;JULIUS, D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**, v.427, n.6971, Jan 15, p.260-5. 2004.

JULIUS, D.;BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.6852, Sep 13, p.203-10. 2001.

KAHLER, C. M.;PISCHEL, A.;KAUFMANN, G.;WIEDERMANN, C. J. Influence of neuropeptides on neutrophil adhesion and transmigration through a lung fibroblast barrier in vitro. **Exp Lung Res**, v.27, n.1, Jan - Feb, p.25-46. 2001.

KARASHIMA, Y.;TALAVERA, K.;EVERAERTS, W.;JANSSENS, A.;KWAN, K. Y.;VENNEKENS, R. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci.**, v.106, p.1273–1278. 2009.

KASHIBA, H.;FUKUI, H.;SENBA, E. Histamine H1 receptor mRNA is expressed in capsaicin-insensitive sensory neurons with neuropeptide Y-immunoreactivity in guinea pigs. **Brain Res**, v.901, n.1-2, May 18, p.85-93. 2001.

KATSURA, H.;OBATA, K.;MIZUSHIMA, T.;YAMANAKA, H.;KOBAYASHI, K.;DAI, Y.;FUKUOKA, T.;TOKUNAGA, A.;SAKAGAMI, M.;NOGUCHI, K. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. **Exp Neurol**, v.200, n.1, Jul, p.112-23. 2006.

KAZNACHEYEVA, E.;GLUSHANKOVA, L.;BUGAJ, V.;ZIMINA, O.;SKOPIN, A.;ALEXEENKO, V. Suppression of TRPC3 leads to disappearance of store-operated channels and formation of a new type of store-independent channels in A431 cells. **J. Biol. Chem.**, v.282, p.23655–23662. 2007.

KHASAR, S. G.;MCCARTER, G.;LEVINE, J. D. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. **J Neurophysiol**, v.81, n.3, Mar, p.1104-12. 1999.

KOCHUKOV, M. Y.;MCNEARNEY, T. A.;FU, Y.;WESTLUND, K. N. Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.291, n.3, Sep, p.C424-32. 2006.

KOLTZENBURG, M.;MCMAHON, S. B. Plasma extravasation in the rat urinary bladder following mechanical, electrical and chemical stimuli: evidence for a new population of chemosensitive primary sensory afferents. **Neurosci Lett** v.72, p.352–356. 1986.

KUMAR, V. E. A. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. In: E. Saunders (Ed.). Philadelphia, 2005. Robbins and Cotran pathologic basis of disease.

LANGER, H. F.;CHAVAKIS, T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. **J Cell Mol Med**, v.13, n.7, Jul, p.1211-20. 2009.

LATORRE, R.;ZAEZER, C.;BRAUCHI, S. Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. **Q Rev Biophys**, v.42, n.3, Aug, p.201-46. 2009.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios? In: Atheneu (Ed.), 2001. Cem bilhões de neurônios?

LEVINE, J. D.;ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: targets for the relief of pain. **Biochim Biophys Acta**, v.1772, n.8, Aug, p.989-1003. 2007.

LEVINE, J. D.;KHASAR, S. G.;GREEN, P. G. Neurogenic inflammation and arthritis. **Ann N Y Acad Sci**, v.1069, Jun, p.155-67. 2006.

LEY, K.;LINNEMANN, G.;MEINEN, M.;STOOLMAN, L. M.;GAEHTGENS, P. Fucoidin, but not yeast polyphosphomannan PPME, inhibits leukocyte rolling in venules of the rat mesentery. **Blood**, v.81, n.1, Jan 1, p.177-85. 1993.

LICHTMAN, M. A.;WILLIAMS, W. J. Williams hematology. In: (Ed.). New York, 2006. Williams hematology

LIEDTKE, W.;TOBIN, D. M.;BARGMANN, C. I.;FRIEDMAN, J. M. Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. **Natl Acad Sci U S A** **100**, p.14531–14536. 2003.

LIU, L.;SHENOY, M.;PASRICHA, P. J. Substance P and calcitonin gene related peptide mediate pain in chronic pancreatitis and their expression is driven by nerve growth factor. **JOP**, v.12, n.4, Jul, p.389-94. 2011.

LO, E. J.;GREEN, P. G.;MIAO, F. J.;RELCHLING, D. B.;LEVINE, J. D. Bradykinin-induced neurogenic migration of neutrophils into the rat knee joint. **Neuroreport**, v.10, n.18, Dec 16, p.3821-4. 1999.

MACPHERSON, L. J.;DUBIN, A. E.;EVANS, M. J.;MARR, F.;SCHULTZ, P. G.;CRAVATT, B. F.;PATAPOUTIAN, A. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. **Nature**, v.445, n.7127, Feb 1, p.541-5. 2007a.

MACPHERSON, L. J.;GEIERSTANGER, B. H.;VISWANATH, V.;BANDELL, M.;EID, S. R.;HWANG, S.;PATAPOUTIAN, A. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. **Curr Biol**, v.15, n.10, May 24, p.929-34. 2005.

MACPHERSON, L. J.;XIAO, B.;KWAN, K. Y.;PETRUS, M. J.;DUBIN, A. E.;HWANG, S.;CRAVATT, B.;COREY, D. P.;PATAPOUTIAN, A. An ion channel essential for sensing chemical damage. **J Neurosci**, v.27, n.42, Oct 17, p.11412-5. 2007b.

MARCEAU, F.;HESS, J. F.;BACHVAROV, D. R. The B1 receptors for kinins. **Pharmacol Rev**, v.50, n.3, Sep, p.357-86. 1998.

MAROTO, R.;RASO, A.;WOOD, T. G.;KUROSKY, A.;MARTINAC, B.;HAMILL, O. P. TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. **Nat Cell Biol**, v.7, p.179–185. 2005.

MASSAAD, C. A.;SAFIEH-GARABEDIAN, B.;POOLE, S.;ATWEH, S. F.;JABBUR, S. J.;SAADE, N. E. Involvement of substance P, CGRP and histamine in the hyperalgesia and cytokine upregulation induced by intraplantar injection of capsaicin in rats. **J Neuroimmunol**, v.153, n.1-2, Aug, p.171-82. 2004.

MCNAMARA, C. R.;MANDEL-BREHM, J.;BAUTISTA, D. M.;SIEMENS, J.;DERANIAN, K. L.;ZHAO, M.;HAYWARD, N. J.;CHONG, J. A.;JULIUS, D.;MORAN, M. M.;FANGER, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, n.33, Aug 14, p.13525-30. 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, n.7203, Jul 24, p.428-35. 2008.

MERCADANTE, S. Problems of long-term spinal opioid treatment in advanced cancer patients. **Pain**, v.79, n.1, Jan, p.1-13. 1999.

MERSKEY, H.;BOGDUK, N. **Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms**. Seattle: IASP Press. 1994. 209-214 p. (Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage)

MESSLINGER, K. Migraine: where and how does the pain originate? **Exp Brain Res**, v.196, n.1, Jun, p.179-93. 2009.

MINKE, B. TRP channels and Ca²⁺ signaling. **Cell Calcium**, v.40, n.3, Sep, p.261-75. 2006.

MUSSAP, C. J.;GERAGHTY, D. P.;BURCHER, E. Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective. **J Neurochem**, v.60, n.6, Jun, p.1987-2009. 1993.

NAGATA, K.;DUGGAN, A.;KUMAR, G.;GARCIA-ANOVEROS, J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. **J Neurosci**, v.25, n.16, Apr 20, p.4052-61. 2005.

NAKAMURA, Y.;UNE, Y.;MIYANO, K.;ABE, H.;HISAOKA, K.;MORIOKA, N.;NAKATA, Y. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 evokes nociception through substance P release from primary sensory neurons. **J Neurochem**, v.120, n.6, Mar, p.1036-47. 2012.

NAONO-NAKAYAMA, R.;SUNAKAWA, N.;IKEDA, T.;MATSUSHIMA, O.;NISHIMORI, T. Subcutaneous injection of endokinin C/D attenuates carrageenan-induced inflammation. **Peptides**, v.31, n.9, Sep, p.1767-71. 2010.

NARUMIYA, S.;FITZGERALD, G. A. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. **J Clin Invest**, v.108, n.1, Jul, p.25-30. 2001.

NEGUS, S. S.;VANDERAH, T. W.;BRANDT, M. R.;BILSKY, E. J.;BECERRA, L.;BORSOOK, D. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. **J Pharmacol Exp Ther**, v.319, n.2, Nov, p.507-14. 2006.

NILIUS, B.;VOETS, T. TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. **Pflugers Arch**, v.451, n.1, Oct, p.1-10. 2005.

NOZAWA, K.;KAWABATA-SHODA, E.;DOIHARA, H.;KOJIMA, R.;OKADA, H.;MOCHIZUKI, S.;SANO, Y.;INAMURA, K.;MATSUSHIME, H.;KOIZUMI, T.;YOKOYAMA, T.;ITO, H. TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.106, n.9, Mar 3, p.3408-13. 2009.

OBATA, K.;KATSURA, H.;MIZUSHIMA, T.;YAMANAKA, H.;KOBAYASHI, K.;DAI, Y.;FUKUOKA, T.;TOKUNAGA, A.;TOMINAGA, M.;NOGUCHI, K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **J Clin Invest**, v.115, n.9, Sep, p.2393-401. 2005.

OKADA, T.;HIRAYAMA, Y.;KISHI, S.;MIYAYASU, K.;HIROI, J.;FUJII, T. Functional neurokinin NK-1 receptor expression in rat peritoneal mast cells. **Inflamm Res**, v.48, n.5, May, p.274-9. 1999.

OKUBO, K.;MATSUMURA, M.;KAWAISHI, Y.;AOKI, Y.;MATSUNAMI, M.;OKAWA, Y.;SEKIGUCHI, F.;KAWABATA, A. Hydrogen sulfide-induced mechanical hyperalgesia and allodynia require activation of both Ca(v) 3.2 and TRPA1 channels in mice. **Br J Pharmacol**, v.166, n.5, Jul, p.1738-43. 2012.

OKUDA, K.;MIYAMOTO, Y.;SKARZYNSKI, D. J. Regulation of endometrial prostaglandin F(2alpha) synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. **Domest Anim Endocrinol**, v.23, n.1-2, Jul, p.255-64. 2002.

OTSUKA, M.;YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiol Rev**, v.73, n.2, Apr, p.229-308. 1993.

PAPIR-KRICHELI, D.;FREY, J.;LAUFER, R.;GILON, C.;CHOREV, M.;SELINGER, Z.;DEVOR, M. Behavioural effects of receptor-specific substance P agonists. **Pain**, v.31, n.2, Nov, p.263-76. 1987.

PARADA, C. A.;REICHLING, D. B.;LEVINE, J. D. Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKCepsilon second messenger pathways. **Pain**, v.113, n.1-2, Jan, p.185-90. 2005.

PARADA, C. A.;TAMBELI, C. H.;CUNHA, F. Q.;FERREIRA, S. H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v.102, n.4, p.937-44. 2001.

PATAPOUTIAN, A.;TATE, S.;WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nat Rev Drug Discov**, v.8, n.1, Jan, p.55-68. 2009.

PEIER, A. M.;MOQRICH, A.;HERGARDEN, A. C.;REEVE, A. J.;ANDERSSON, D. A.;STORY, G. M. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell** v.108, p.705-715. 2002.

PETRUS, M.;PEIER, A. M.;BANDELL, M.;HWANG, S. W.;HUYNH, T.;OLNEY, N.;JEGLA, T.;PATAPOUTIAN, A. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. **Mol Pain**, v.3, p.40. 2007.

PRASAD, P.;YANAGIHARA, A. A.;SMALL-HOWARD, A. L.;TURNER, H.;STOKES, A. J. Secretogranin III directs secretory vesicle biogenesis in mast cells in a manner dependent upon interaction with chromogranin A. **J Immunol**, v.181, n.7, Oct 1, p.5024-34. 2008.

REGOLI, D.;BOUDON, A.;FAUCHERE, J. L. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacol Rev**, v.46, n.4, Dec, p.551-99. 1994.

RICCIO, A.;MATTEI, C.;KELSELL, R. E.;MEDHURST, A. D.;CALVER, A. R.;RANDALL, A. D. Cloning and functional expression of human short TRP7, a candidate protein for store-operated Ca²⁺ influx. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.12302–12309. 2002.

ROBERTS, K.;SHENOY, R.;ANAND, P. A novel human volunteer pain model using contact heat evoked potentials (CHEP) following topical skin application of transient receptor potential agonists capsaicin, menthol and cinnamaldehyde. **J Clin Neurosci**, v.18, n.7, Jul, p.926-32. 2011.

ROMERO-CALVO, I.;OCON, B.;MARTINEZ-MOYA, P.;SUAREZ, M. D.;ZARZUELO, A.;MARTINEZ-AUGUSTIN, O.;DE MEDINA, F. S. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Anal Biochem**, v.401, n.2, Jun 15, p.318-20. 2010.

SMITH, M. P.;BEACHAM, D.;ENSOR, E.;KOLTZENBURG, M. Cold-sensitive, menthol-insensitive neurons in the murine sympathetic nervous system. **Neuroreport**, v.15, n.9, Jun 28, p.1399-403. 2004.

STORY, G. M.;PEIER, A. M.;REEVE, A. J.;EID, S. R.;MOSBACHER, J.;HRICIK, T. R.;EARLEY, T. J.;HERGARDEN, A. C.;ANDERSSON, D. A.;HWANG, S. W.;MCINTYRE, P.;JEGLA, T.;BEVAN, S.;PATAPOUTIAN, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, v.112, n.6, Mar 21, p.819-29. 2003.

STRENG, T.;AXELSSON, H. E.;HEDLUND, P.;ANDERSSON, D. A.;JORDT, S. E.;BEVAN, S.;ANDERSSON, K. E.;HOGESTATT, E. D.;ZYGUMUNT, P. M. Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. **Eur Urol**, v.53, n.2, Feb, p.391-9. 2008.

SZAREK, J. L.;SPURLOCK, B.;GRUTTER, C. A.;LEMKE, S. Substance P and capsaicin release prostaglandin E2 from rat intrapulmonary bronchi. **American Journal of Physiology**, v.275, n.5, p.L1006-L1012. 1998.

TAMBELI, C. H.;OLIVEIRA, M. C.;CLEMENTE, J. T.;PELEGRINI-DA-SILVA, A.;PARADA, C. A. A novel mechanism involved in 5-hydroxytryptamine-induced nociception: the indirect activation of primary afferents. **Neuroscience**, v.141, n.3, Sep 1, p.1517-24. 2006.

TAYLOR-CLARK, T. E.;UNDEM, B. J.;MACGLASHAN, D. W., JR.;GHATTA, S.;CARR, M. J.;MCALEXANDER, M. A. Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). **Mol Pharmacol**, v.73, n.2, Feb, p.274-81. 2008.

THEOHARIDES, T. C.;DONELAN, J.;KANDERE-GRZYBOWSKA, K.;KONSTANTINIDOU, A. The role of mast cells in migraine pathophysiology. **Brain Res Brain Res Rev**, v.49, n.1, Jul, p.65-76. 2005.

TJOLSEN, A.;HOLE, K. Animal models of analgesia. In: Dickenson, A.; Besson, J. M. (Ed.). **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer-Verlag, p.p 1-20. 1997.

TOMINAGA, M.;CATERINA, M. J.;MALMBERG, A. B.;ROSEN, T. A.;GILBERT, H.;SKINNER, K. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v.21, p.531–543. 1998.

TONUSSI, C. R.;FERREIRA, S. H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **Eur J Pharmacol**, v.251, n.2-3, Jan 14, p.173-9. 1994.

TREVISANI, M.;SIEMENS, J.;MATERAZZI, S.;BAUTISTA, D. M.;NASSINI, R.;CAMPI, B.;IMAMACHI, N.;ANDRE, E.;PATACCHINI, R.;COTTRELL, G. S.;GATTI, R.;BASBAUM, A. I.;BUNNETT, N. W.;JULIUS, D.;GEPPETTI, P. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, n.33, Aug 14, p.13519-24. 2007.

UEDA, H. In vivo molecular signal transduction of peripheral mechanisms of pain. **Jpn. J. Pharmacol**. 1999.

VERRI, W. A., JR.;CUNHA, T. M.;PARADA, C. A.;POOLE, S.;CUNHA, F. Q.;FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol Ther**, v.112, n.1, Oct, p.116-38. 2006.

WALKER, K. M.;URBAN, L.;MEDHURST, S. J.;PATEL, S.;PANESAR, M.;FOX, A. J. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. **J Pharmacol Exp Ther**, v.304, p.56–62. 2003.

WANG, S.;DAI, Y.;FUKUOKA, T.;YAMANAKA, H.;KOBAYASHI, K.;OBATA, K.;CUI, X.;TOMINAGA, M.;NOGUCHI, K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain**, Mar 20. 2008.

WEIGERT, A.;JENNEWEIN, C.;BRUNE, B. The liaison between apoptotic cells and macrophages--the end programs the beginning. **Biol Chem**, v.390, n.5-6, May-Jun, p.379-90. 2009.

WHITTLE, B. J. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Fundam Clin Pharmacol**, v.17, n.3, Jun, p.301-13. 2003.

WOODCOCK, J.;WITTER, J.;DIONNE, R. A. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. **Nat Rev Drug Discov**, v.6, n.9, Sep, p.703-10. 2007.

WOOLF, C. J.;SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v.288, n.5472, Jun 9, p.1765-9. 2000.

XU, H.;BLAIR, N. T.;CLAPHAM, D. E. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. **J Neurosci** v.25, p.8924–8937. 2005.

XU, X.;WANG, P.;ZOU, X.;LI, D.;FANG, L.;GONG, K.;LIN, Q. The effects of sympathetic outflow on upregulation of vanilloid receptors TRPV(1) in primary afferent neurons evoked by intradermal capsaicin. **Exp Neurol**, v.222, n.1, Mar, p.93-107. 2010.

YANG, J.;LI, Y.;ZUO, X.;ZHEN, Y.;YU, Y.;GAO, L. Transient receptor potential ankyrin-1 participates in visceral hyperalgesia following experimental colitis. **Neurosci Lett**, v.440, n.3, Aug 8, p.237-41. 2008.

YONEKAWA, K.;HARLAN, J. M. Targeting leukocyte integrins in human diseases. **J Leukoc Biol**, v.77, n.2, Feb, p.129-40. 2005.

ZEILHOFER, H. U. Synaptic modulation in pain pathways. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v.154, p.73-100. 2005.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, n.2, Jun, p.109-10. 1983.

ZURBORG, S.;YURGIONAS, B.;JIRA, J. A.;CASPANI, O.;HEPPENSTALL, P. A. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. **Nat Neurosci**, v.10, n.3, Mar, p.277-9. 2007.

ZYGMUNT, P. M.;PETERSSON, J.;ANDERSSON, D. A.;CHUANG, H.;SØRGÅRD, M.;DI MARZO, V. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**, v.400, p.452–457. 1999.